

抗 SARS 疫苗

技术领域

本发明涉及病毒学领域，具体而言涉及 SARS 冠状病毒基因组的核苷酸序列以及这些序列中的部分片段用于制备 DNA 疫苗，表达相应的蛋白质的用途。也涉及这些蛋白用于疾病预防和治疗的用途。

背景技术

自从 2002 年 11 月在我国广东省发现第一例严重急性呼吸系统综合症(SARS)以来，在过去的半年多的时间里，全球感染人数和地区不断增加。根据来自世界卫生组织网站的数据，截至 2003 年 6 月 6 日，全球累计报告病例达到 8404 人，遍及 32 个国家和地区，夺去了 779 人的生命。

严重急性呼吸系统综合症是一种新型的传染性很强的呼吸系统疾病，英文名称为 Severe Acute Respiratory Syndrome，简称 SARS。它不同于以往出现的非典型肺炎。以往的非典型肺炎(Atypical Pneumonia, ATP)通常是可以治疗的，而且很少有生命危险。而严重急性呼吸系统综合症的传染性很强，而且会产生呼吸窘迫而死亡。对于严重急性呼吸系统综合症的病原研究发现了一种新的冠状病毒，并命名为 SARS 冠状病毒。

冠状病毒最先于 1937 年从鸡身上分离出来。于 1968 年由一个叫秦瑞的科学家在电子显微镜下发现冠状病毒的外膜呈日冕状或者皇冠状突起，由此命名为“冠状病毒”。

1975 年病毒命名委员会正式命名了冠状病毒科。根据病毒的血清学特点和核苷酸序列的差异，目前冠状病毒分为冠状病毒和环曲病毒两个属。

冠状病毒科的分类：

代表株为禽传染性支气管炎病毒 (Avian infectious bronchitis virus, IBV)

其它成员有：

人冠状病毒 (Human coronavirus)

鼠肝炎病毒 (Murine virus hepatitis, MHV)

猪血凝性脑脊髓炎病毒 (Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus)

猪传染性胃肠炎病毒 (Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)

初生犊腹泻冠状病毒 (Neonatal calf diarrhea coronavirus, BCV)

大鼠冠状病毒 (Rat coronavirus, RCV)

火鸡蓝冠病毒 (Turkey bluecomb virus)

猫传染性腹膜炎病毒 (Feline infectious peritonitis virus)

可能成员有：

BEST AVAILABLE COPY

犬冠状病毒 (Canine coronavirus)

大鼠涎腺腺炎病毒 (Sialodacryoadenitis virus of rat)

人肠道冠状病毒 (Human enteric coronavirus)

冠状病毒的理化特征：冠状病毒大约 60-220 纳米直径，外形呈皇冠状，故称为冠状病毒。冠状病毒由单一的核糖核酸 (RNA) 构成，这种 RNA 和 N 蛋白共同组成病毒。其遗传物质是 RNA，有三个结构蛋白，属糖蛋白。它的特点是，RNA 和 RNA 之间重组率非常高，出现变异正是由于这种很高的重组率。重组后，RNA 变了，其序列发生了变化；蛋白也变了，蛋白的氨基酸序列也变了。

冠状病毒的流行病学：到目前为止，大约 15 种不同冠状病毒株被发现，有些可使人发病，另一些可使牛，猪，鼠，猫，狗和鸟类发病，特别是鸡瘟疫和犬瘟疫。犬瘟疫表现为一种急性胃肠道传染病，其临床特征为腹泻。病原是冠状病毒，主要存在于病犬的胃肠道内，并随粪便排出，污染饲料和周围环境。因此，犬冠状病毒主要经消化道感染。病毒对外界环境的抵抗力较强。粪便中的病毒可存活 6~9 天，污染物在水中可保持数天的传染性。因此，犬群中一旦发生本病，很难在短时间内控制其流行和传播。病毒对热敏感，紫外线、来苏儿、0.1%过氧乙酸及 1%克辽林等都可在短时间内将病毒杀死。

冠状病毒可感染人和家禽、家畜，可引起家禽的传染性支气管炎、鼠肝炎、猪脑脊髓炎、猫传染性腹膜炎等。冠状病毒引起的人类疾病有两类，首先是呼吸道感染，其次是肠道感染。

对冠状病毒的病毒分离工作难度很大，需用人胚胎细胞、气管及鼻粘膜细胞，经器官培养方能分离。增殖病毒亦很困难，也要用上述材料。

该病毒对温度很敏感，33℃生长良好，35℃就受到抑制。由于这个特性，由它引起的疾病流行多发生在冬季和早春季节。

对冠状病毒目前尚无特异的预防和治疗药物。

特异性预防，即针对性预防措施应当是疫苗。疫苗的研制是有可能的，但需要时间较长，解决病毒繁殖问题是其难题。

非特异性预防措施即卫生部已公布的预防春季呼吸道传染病措施，如保暖、洗手、通风、勿过度疲劳及勿接触病人，少去人多的公共场所等。治疗主要是对症治疗。冠状病毒感染在全世界非常普遍，人群中普遍存在冠状病毒抗体，成年人高于儿童。各国报道的人群抗体阳性率不同，我国人群以往冠状病毒中和抗体阳性率在 30%至 60%。呼吸道冠状病毒感染通过空气飞沫传播，感染高峰在秋冬和早春。有报道认为不同病毒的流行有不同的周期性，一般间隔 2 至 3 年流行一次。冠状病毒感染引起的免疫应答较差，再次感染较常见。

冠状病毒的临床特点：冠状病毒是成人普通感冒的主要病原之一，在儿童可以引起上呼吸道感染，一般很少波及下呼吸道。冠状病毒感染的潜伏期一般为 2 至 5 天，平均为 3 天。典型的冠状病毒感染呈流涕、不适等感冒症状。不同型别

病毒的致病力不同,引起的临床表现也不尽相同,OC43株引起的症状一般比229E病毒严重。有报道冠状病毒感染可以出现发热、寒战、呕吐等症状。病程一般在1个星期左右,临床过程轻微,没有后遗症。

冠状病毒还可以引起婴儿、新生儿急性肠胃炎,主要症状是水样大便、发热、呕吐,每天10余次,严重者可以出现血水样便。

文献报告冠状病毒的感染可以产生以下临床症状:

- 1) 呼吸系统感染,包括重症急性呼吸系统综合症(SARS);
- 2) 肠道感染(婴儿偶尔发生);
- 3) 神经系统症状(很少)。

冠状病毒通过呼吸道分泌物排出体外,经口液、喷气、接触传染。临床上,多数冠状病毒引起轻度和自愈性疾病,但少数可有神经系统并发症。

2003年4月16日,世界卫生组织正式确认引起SARS的病原体是冠状病毒的一个变种,将其命名为“SARS冠状病毒”。它与流感病毒有亲缘关系,但又非常独特,从前从未在人类身上发现。如前所述,冠状病毒是一类直径为80~220纳米的球状正链RNA囊膜病毒。其囊膜上有形状类似日冕的棘突,故命为冠状病毒。进一步研究表明,囊膜上一般有两种糖蛋白:S蛋白,M蛋白。其中S蛋白负责诱导病毒囊膜与宿主细胞膜的膜融合,激发机体产生中和抗体的体液免疫和细胞免疫反应。病毒内包有病毒的遗传物质RNA,长约26~32kb,在所有RNA病毒中是最长的。另有核衣壳蛋白,称为N蛋白,它与病毒RNA的复制和出芽有关。当冠状病毒进入到宿主细胞中,首先翻译合成病毒的RNA聚合酶。在RNA聚合酶的指导下完成病毒感染的早期事件,进而实现病毒的转录、复制、翻译和新病毒的组装。基因组包含了数目不等的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF),在各个ORF之间有基因重叠区或基因间隔区。在所有的冠状病毒基因结构中,基因顺序是一致的:5'-RNA聚合酶基因-S蛋白基因-E蛋白基因-M蛋白基因-N蛋白基因-3',SARS冠状病毒也不例外。但此病毒与已知的冠状病毒又有很大的不同。冠状病毒可引起人和许多动物的呼吸道、消化道、肝脏和神经系统产生疾病,根据病毒的血清学特性和核苷酸序列的同源性将冠状病毒分为3群:群一包括人呼吸道冠状病毒229E、猪传染性胃肠炎病毒、猫肠道冠状病毒和犬冠状病毒等;群二的成员有人呼吸道冠状病毒OC43、牛冠状病毒、猪凝血性脑脊髓炎病毒等;群三含有禽传染性支气管炎病毒等。将SARS冠状病毒的基因序列与已知的3个病毒群进行比较,并绘制几种重要的结构蛋白的系统进化树,发现SARS病毒与其他群中的任何一个都不紧密相关。

作为一种烈性传染病的病原体的SARS冠状病毒变异很快,研究该病原体的遗传信息、结构和增殖周期对于制备疫苗和设计寻找药物十分重要,也迫切需要诊断用试剂和方法。

发明内容

本发明的发明人测定了一种 SARS 冠状病毒的病毒株的基因组序列，也提供了这种序列的一些用途。

第一个方面，本发明提供了 SARS 冠状病毒的基因组序列。从患非典型肺炎死亡的病人的病变组织中提取总 RNA，合成 cDNA，对 SARS 冠状病毒的病毒株基因组进行测序，发现该基因组含有的核苷酸数目为 29760 个，表示在 SEQ ID NO:1 中。在本发明的优先权文件中已经记载了与该序列相比在其 5'端缺少 15 个核苷酸的序列，其中记载的序列共有 29745 个核苷酸。本发明提供的 SARS 冠状病毒基因组序列已经收录在 GenBank 中，Accession No. AY390556 [gi:41323719]。

对 SARS 病毒基因组序列的初步分析表明，该病毒至少含有 11 个开放阅读框 (ORFs)，分别编码病毒的刺突蛋白 (spike, S)、膜蛋白 (membrane, M)、包膜蛋白 (envelope, E) 和核壳蛋白 (nucleocapsid, N)，和一个可产生数个蛋白的 orflab。其中 S 蛋白是一种重要的抗原决定蛋白。在细胞中 S 和 M 蛋白插入内质网，同时 N 蛋白与复制好的 RNA 相联，然后这一蛋白-RNA 复合体连接在 M 蛋白上一起进入内质网，参见 Tin-Yun Ho, Shih-Lu Wu, et al. Antigenicity and receptor-binding ability of recombinant SARS coronavirus spike protein. Biochemical and Biophysical Research Communications 313, 2004, 938-947。

第二个方面，本发明提供了分离的多核苷酸，该分离的多核苷酸包括选自：
a. SEQ ID NO:1 所示的多核苷酸序列；b. 与 SEQ ID NO:1 所示的序列相比，具有至少 90% 的序列同源性的天然多核苷酸序列；和，与 a) 或 b) 互补的多核苷酸序列。

第三个方面，本发明提供了分离的多核苷酸，该分离的多核苷酸是采用下列引物，以 SARS 冠状病毒的基因组序列为模板，经过 PCR 扩增制备的。

第一组引物：上游引物 5' ACA GGA TCC AAG AAC ATG TTT ATT TTC TTA TT 3'，下游引物 5' AGA TCT GAA TTC TAT CCA ATA GGA ATG TCG CAC TC 3'；

第二组引物：上游引物 5' ATT GGA TCC ACC ATG GGC TGT CTT ATA GGA JCT GAG C 3'，下游引物 5' ATG GAT CCG AAT TCT GGC TGT GCA GTA ATT GAT CT 3'；

第三组引物：上游引物 5' CAA GGA TCC GTT ATG TAC TCA TTC GTT TCG 3'，下游引物 5' ACA AGA TCT GAA TTC TTT AAG CTC CTC AAC GGT AA 3'；

第四组引物：上游引物 5' ACA GGA TCC ATC ATG GCA GAC AAC GGT AC 3'，下游引物 5' AAC AGA TCT GAA TTC GCA ATC CTG AAA GTC CTC ATA 3'；

第五组引物：上游引物 5' ATT GGA TCC GTC ATG GAC AAT AAC CAG AAT GGA GGA CG 3'，下游引物 5' AAC AGA TCT GAA TTC ATT CTG CAC AAG AG 3'；

第六组引物:上游引物 5' ACA CCA TGG AAT TCG ACA TGG CTA TTT CAC CGA AG 3', 下游引物 5' CAG GTA CCG GAT CCA ATA TTG CAG CAG TAC GCA C 3'。

扩增的模板为是具有表示在 SEQ ID NO:1 中的核苷酸序列的分子,例如 cDNA 分子。扩增方法和条件是本技术领域已知的,可以参考《分子克隆实验指南》(J Sambrook E. F. Fritsch T. Maniatis, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 进行。

第四个方面, 本发明提供了分离的多肽片段, 该分离的多肽片段是由本发明的第一个方面的 SARS 冠状病毒的基因组序列的多核苷酸编码的, 也即 SEQ ID NO:1 所示核酸序列编码的多肽。

第五个方面, 本发明提供了分离的多肽片段, 该分离的多肽片段是由本发明第三个方面所述的分离的多核苷酸编码的。

第六个方面, 本发明提供了分离的多核苷酸, 它们是与本发明第三个方面所述的分离的多核苷酸具有至少 90% 的序列同源性的天然多核苷酸序列。

第七个方面, 本发明提供了分离的多肽片段, 它们是与本发明第四个方面所述的分离的多肽片段具有至少 90% 的序列同源性的天然多肽序列。

第八个方面, 本发明提供了与本发明中所述的分离的多肽片段能够特异性结合的抗体。在一个实施方案中, 这些抗体是单克隆抗体。

第九个方面, 本发明提供了含有本发明中所述的分离多核苷酸和多肽片段和药学上可以接受的载体的药物组合物。

第十个方面, 本发明提供了含有本发明中所述的分离多核苷酸的检测试剂盒。

第十一个方面, 本发明提供了含有本发明中所述的分离多核苷酸的重组腺病毒。

第十二个方面, 本发明提供了含有上述第十一个方面所述的重组腺病毒的疫苗。

上述方面是本发明的简要概括, 本发明并不限于这些。本发明的其他部分的说明, 以及在不背离本发明精神和实质, 或者在利用本发明进行的简单修改和改进在本发明的范围之内。

在本发明的一个实施方案中, 发现了六个片段编码的多肽或者蛋白可以在体内激发针对 SARS 冠状病毒的免疫反应, 所以将这些片段可以作为 DNA 疫苗使用。它们是本发明第三个方面中利用六组引物, 以 SARS 冠状病毒的基因组序列为模板, 经过 PCR 扩增制备的多核苷酸, 分别记作 SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:6 和 SEQ ID No:7。

对于本发明所述的 DNA 疫苗, 其中 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列, 也可以包括与该核苷酸序列的同源性大于 90% 的序列, 优选是包括选自 SEQ ID No:2、SEQ ID

No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:6 和 SEQ ID No:7 的核酸片段或者与其同源性大于 90% 的核酸片段。

在本发明的另一个实施方案中,提供了一种蛋白质疫苗,该疫苗含有将 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列进行表达所得到的多肽或者蛋白质片段。

发明人认识到 SEQ ID NO:1 所编码的产物具有免疫源性,具有一定的生物活性,具有应用价值。在本发明中,采用任何读码方式,从 SEQ ID NO:1 所得到的翻译产物均在本发明范围之内。对 SEQ ID NO:1 所揭示的序列,在翻译中,可以阅读部分序列,阅读的起点可以不同,所得到的产物均在本发明之内。将对应于 SEQ ID NO:1 全长的氨基酸序列记为 SEQ ID NO:8。

本发明包括分离的多肽序列,包含选自下列氨基酸序列:

- a) SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;
- b) 具有至少 90% 的序列与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列相同的天然氨基酸序列;
- c) SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的生物活性片段; 和
- d) SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的免疫原性片段。

在本发明的另一个实施方案中,提供了一种蛋白质疫苗,其中含有序列 SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:6 和 SEQ ID No:7 所编码的蛋白质,将这些蛋白质中的氨基酸序列分别表示为 SEQ ID No:9、SEQ ID No:10、SEQ ID No:11、SEQ ID No:12、SEQ ID No:13 和 SEQ ID No:14。

在又一个实施方案中,是基于 SEQ ID No:1 所设计的 DNA 片段或者 RNA 片段,它们可以作为诊断用探针,也可以作为基因芯片的组成部分使用。更进一步而言,或是治疗用分子,比如反义 RNA 分子,其与本发明公开的 SARS 病毒全基因组序列相同或者具有互补性,也可以与本发明公开基因组序列部分相同或者互补,比如在 SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:6 和 SEQ ID No:7 中所表示的片段。依据本发明的基因组信息设计可以与其结合从而阻止 SARS 病毒的复制、转录或者翻译过程的各种核酸分子或其片段,以及将设计的核酸分子或其片段插入各种载体进行表达或者直接使用均包括在本发明之中。

在一个实施方案中,本发明所述核苷酸序列被插入载体中。载体的种类不加限制。载体可以导入宿主细胞中,其中所述细胞是原核细胞或真核细胞。进一步而言,宿主细胞表达 SARS 病毒的有关蛋白质。核酸探针,包含至少 15 个核苷酸,可与含有 SEQ ID No:1 所列的核苷酸序列的核酸序列进行特异杂交。

进一步而言,本发明的核酸探针可以用可探测标记进行标记,可以用于 SARS 感染的检测,提高了检测的灵敏性。

本发明的基因组测序将有助于人类和潜在的动物宿主中的 SARS 病毒感染的诊断(使用 PCR 和免疫试验),有助于抗病毒药物的开发(包括中和抗体),并

且有助于鉴定用于疫苗开发的推定的抗原决定簇。基因组信息也有助于制备基因芯片，用于检测和诊断。

本发明还尤其提供了 SARS 冠状病毒的基因组序列中的特有的含有 29 个核苷酸的序列，即 SEQ ID No:1 中的第 27891 位到第 27919 位的核苷酸序列，命名为 SEQ ID No:15，其序列如下：

CCTACTGGTTACCAACCTGAATGGAATAT

以该序列为基础，可以制备用于检测的试剂盒等。

本发明提供的技术方案总结如下：

1. 一种分离的多核苷酸，选自下述序列：a. SEQ ID NO:1 的多核苷酸序列；b. 具有至少 90% 的序列与 SEQ ID NO:1 的序列相同的天然多核苷酸序列；和，a) 或 b) 互补的多核苷酸序列。
2. 一种分离的多核苷酸序列，编码包含一段选自下列氨基酸序列的多肽：a. SEQ ID NO:8；b. 具有至少 90% 的序列与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列相同的天然氨基酸序列；c. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的生物活性片段；和，d. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的免疫原性片段。
3. 一种分离的多核苷酸，选自：a. 选自 SEQ ID NO:2-7 的多核苷酸序列；b. 具有至少 90% 的序列与选自 SEQ ID NO:2-7 的序列相同的天然多核苷酸序列；和，c. 与 a) 或 b) 互补的多核苷酸序列。
4. 一种分离的多肽序列，包含选自下列氨基酸序列：a. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列；b. 具有至少 90% 的序列与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列相同的天然氨基酸序列；c. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的生物活性片段；和，d. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的免疫原性片段。
5. 一种能够对 SARS 病毒产生免疫反应的分离的多肽片段，选自：a. 选自 SEQ ID NO:9-14 的多核苷酸序列；b. 具有至少 90% 的序列与选自 SEQ ID NO:9-14 的序列相同的天然多核苷酸序列。
6. 一种能与上述第 4 项所述的多肽特异结合的分离抗体。
7. 一种能与上述第 5 项所述的多肽特异结合的分离抗体。
8. 上述第 6 项中的分离抗体是单克隆抗体。
9. 上述第 7 项中的分离抗体是单克隆抗体。
10. 一种药物组合物，含有有效量的上述第 4 项所述的多肽，和药学上可接受的载体。
11. 一种药物组合物，含有有效量的上述第 5 项所述的多肽，和药学上可接受的载体。
12. 一种药物组合物，含有有效量的上述第 1 项所述的多核苷酸，和药学上可接受的载体。
13. 一种药物组合物，含有有效量的上述第 2 项所述的多核苷酸，和药学上可

接受的载体。

14. 一种药物组合物，含有有效量的上述第 3 项所述的多核苷酸和药学上可接受的载体。

15. 一种药物组合物，含有与药学上可接受的载体相结合的上述第 6 项所述的抗体。

16. 一种药物组合物，含有与药学上可接受的载体相结合的上述第 7 项所述的抗体。

17. 一种药物组合物，含有与药学上可接受的载体相结合的上述第 8 项所述的抗体。

18. 一种药物组合物，含有与药学上可接受的载体相结合的上述第 9 项所述的抗体。

19. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的诊断试剂盒，含有上述第 1 项所述的多核苷酸和药学上可接受的载体。

20. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的诊断试剂盒，含有上述第 2 项所述的多核苷酸和药学上可接受的载体。

21. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的诊断试剂盒，含有上述第 3 项所述的多核苷酸和药学上可接受的载体。

22. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的探针，含有至少 20 个连续多核苷酸，该序列与样品中的 SARS 病毒多核苷酸序列互补，所述探针在该探针与 SARS 病毒多核苷酸之间形成杂交复合体的条件下，特异性与 SARS 病毒多核苷酸杂交。

23. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的探针，含有 SEQ ID NO:15 的多核苷酸序列。

24. 一种检验样品中 SARS 病毒的多核苷酸的方法，所述 SARS 病毒多核苷酸具有上述第 1 项所述的多核苷酸序列，该方法包括：a. 用探针杂交样品，此探针含有至少 20 个连续多核苷酸，包含与样品中的 SARS 病毒多核苷酸序列互补的序列，所述探针在该探针与 SARS 病毒多核苷酸之间形成杂交复合体的条件下，特异性与 SARS 病毒多核苷酸杂交；和，b. 检测所述杂交复合体存在与否，如果存在，可选择性检测所述杂交复合体的量。

25. 一种检验样品中 SARS 病毒的多核苷酸的方法，所述 SARS 病毒多核苷酸具有上述第 2 项所述的多核苷酸序列，该方法包括：a. 用探针杂交样品，此探针含有至少 20 个连续多核苷酸，包含与样品中的 SARS 病毒多核苷酸序列互补的序列，所述探针在该探针与 SARS 病毒多核苷酸之间形成杂交复合体的条件下，特异性与 SARS 病毒多核苷酸杂交；和，b. 检测所述杂交复合体存在与否，如果存在，可选择性检测所述杂交复合体的量。

26. 一种检验样品中 SARS 病毒的多核苷酸的方法，所述 SARS 病毒多核苷酸具有上述第 3 项所述的多核苷酸序列，该方法包括：a. 用探针杂交样品，此探针

含有至少 20 个连续多核苷酸，包含与样品中的 SARS 病毒多核苷酸序列互补的序列，所述探针在该探针与 SARS 病毒多核苷酸之间形成杂交复合体的条件下，特异性与 SARS 病毒多核苷酸杂交；和，b. 检测所述杂交复合体存在与否，如果存在，可选择性检测所述杂交复合体的量。

27. 上面第 24 项所述的方法，其中探针含有至少 30 个连续的核苷酸。

28. 上面第 25 项所述的方法，其中探针含有至少 30 个连续的核苷酸。

29. 上面第 26 项所述的方法，其中探针含有至少 30 个连续的核苷酸。

30. 上面第 24 项所述的方法，其中探针含有至少 50 个连续的核苷酸。

31. 上面第 25 项所述的方法，其中探针含有至少 50 个连续的核苷酸。

32. 上面第 26 项所述的方法，其中探针含有至少 50 个连续的核苷酸。

33. 一种检测生物样品中编码 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的方法，包括以下步骤：a. 上述第 1 项的多核苷酸与生物样品中的核酸物质杂交，形成杂交复合体；和，b. 检测所述杂交复合体，其中所述杂交复合体的存在与所述生物样品中编码 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的存在相关。

34. 一种检测生物样品中编码 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的方法，包括以下步骤：a. 上述第 2 项所述的多核苷酸与生物样品中的核酸物质杂交，形成杂交复合体；和，b. 检测所述杂交复合体，其中所述杂交复合体的存在与编码所述生物样品中 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的存在相关。

35. 一种检测生物样品中编码 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的方法，包括以下步骤：a. 上述第 3 项所述的多核苷酸与生物样品中的核酸物质杂交，形成杂交复合体；和，b. 检测所述杂交复合体，其中所述杂交复合体的存在与编码所述生物样品中 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的存在相关。

36. 一种有效抵抗人 SARS 病毒感染的疫苗，包含具有选自 SEQ ID NO:1-7 的序列的肽，和药学上可接受的载体。

37. 一种有效抵抗人 SARS 病毒感染的疫苗，包含具有选自 SEQ ID NO:8-14 的序列的肽，和药学上可接受的载体。

38. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；和

b. 至少一个多肽片段，选自刺突蛋白、小膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白。

39. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；和

b. 两个多肽片段，选自刺突蛋白、小膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白。

40. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不

能复制它自身；和

b. 三个多肽片段，选自刺突蛋白、小膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白。

41. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；和

b. 多个多肽片段，选自刺突蛋白、小膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白。

42. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；

b. SARS 病毒的刺突蛋白；和

c. 小包膜蛋白。

43. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；

b. SARS 病毒的刺突蛋白；和

c. 小膜蛋白。

44. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；

b. SARS 病毒的刺突蛋白；

c. 小膜蛋白；和

d. 小包膜蛋白。

45. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；

b. 小包膜蛋白；

c. 小膜蛋白；和

d. 核衣壳蛋白。

46. 一种 SARS 疫苗，含有上述第 38 项所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

47. 一种 SARS 疫苗，含有上述第 39 项所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

48. 一种 SARS 疫苗，含有上述第 40 项所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

49. 一种 SARS 疫苗，含有上述第 41 项所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

50. 一种 SARS 疫苗, 含有上述第 42 项所述的重组腺病毒, 和药学上可接受的载体。

51. 一种 SARS 疫苗, 含有上述第 43 所述的重组腺病毒, 和药学上可接受的载体。

52. 一种 SARS 疫苗, 含有上述第 44 所述的重组腺病毒, 和药学上可接受的载体。

53. 一种 SARS 疫苗, 含有上述第 45 所述的重组腺病毒, 和药学上可接受的载体。

54. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的上述第 46 项所述的疫苗。

55. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的上述第 47 项所述的疫苗。

56. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的上述第 48 项所述的疫苗。

57. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的上述第 49 项所述的疫苗。

58. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的上述第 50 项所述的疫苗。

59. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的上述第 51 项所述的疫苗。

60. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的上述第 52 项所述的疫苗。

61. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的上述第 53 项所述的疫苗。

62. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 46 项所述的疫苗。

63. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 47 项所述的疫苗。

64. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 48 项所述的疫苗。

65. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 49 项所述的疫苗。

66. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 50 项所述的疫苗。

67. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 51 项所述的疫苗。

68. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 52 项所述的疫苗。

69. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 53 项所述的疫苗。

70. 上述第 62 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

71. 上述第 63 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

72. 上述第 64 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

73. 上述第 65 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

74. 上述第 66 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

75. 上述第 67 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

76. 上述第 68 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

77. 上述第 69 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

78. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 46 项所述的疫苗。

79. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 47 项所述的疫苗。

80. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 48 项所述的疫苗。

81. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 49 项所述的疫苗。

82. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 50 项所述的疫苗。

83. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 51 项所述的疫苗。

84. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 52 项所述的疫苗。

85. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用上述第 53 项所述的疫苗。

86. 上述第 78 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

87. 上述第 79 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

88. 上述第 80 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

89. 上述第 81 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

90. 上述第 82 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

91. 上述第 83 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

92. 上述第 84 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

93. 上述第 85 项所述的方法, 其中所述受试者是人类。

发明详述

本发明的发明人对在 2003 年 1 月 31 日并死亡于 2003 年 2 月 10 日的 SARS 患者进行了第一例尸解病理研究, 确定死亡原因, 并进行病原学研究。方法: 对非典型肺炎死亡病人进行尸体解剖, 病变组织进行超薄切片电镜观察, 对病变组织抽提总 RNA 合成 cDNA, 并测定 SARS 冠状病毒全基因组序列。结果: 尸解检查观察到肺组织广泛性实变, 肺水肿, 肺出血, 肺灶性出血性梗死。病变肺组织超薄切片电镜观察到病毒颗粒存在于 II 型肺泡上皮细胞内。序列测定检出完整的 SARS 冠状病毒全基因组序列(序列命名为 GZ02102003), 即本发明中 SEQ ID NO: 1 中所揭示的序列。

发明人所进行的上述研究的详细情况如下:

1.1 病人: 死者女, 62 岁, 广州市居民, 2003 年 1 月 31 日开始发热, 流涕, 咽痛, 咳嗽, 2 月 4 日因病情加重, 出现呼吸困难等症状, 诊断为非典型肺炎随即转院至广州市第八人民医院救治, 病情未见好转, 呼吸困难进一步加重, 于 2003 年 2 月 10 日 0 点 15 分因呼吸心跳停止死亡。我们于第二天(2003 年 2 月 11 日)15 点在第一军医大学南方医院对尸体进行了病理学解剖。

1.2 电镜检查

将肺组织用 1% 锇酸固定 30 分钟, PBS 洗涤后用梯度丙酮脱水, 环氧树脂包埋。超薄切片后用铀铅双重染色, 电镜观察。

1.3 病毒全序列测定与分析

1.3.1 总 RNA 的提取 使用美国 Invitrogen 公司 TRIZOL Reagent 试剂盒。参照试剂盒使用说明进行。

1.3.2 cDNA 合成和全序列测定 用 ThermoScript (Invitrogen, USA) 和随机引物合成 cDNA。根据已公开的 SARS 冠状病毒全序列设计覆盖 SARS 病毒全基因的 PCR 引物, 每对 PCR 引物扩增约 1kb 长的产物, 相邻引物对有约 200 碱基长的重叠区。PCR 反应为 39 个循环 25 ul 总体积, 反应条件为前 14 个循环退火温度每循环下降 0.5°C。PCR 产物的测序使用 ABI Big Dye Terminator 试剂在 ABI377 机器上进行。所测定序列的组合使用源于 University of Washington 的 “Phred, Phrap and Consed” 程序。

结果

2.1 大体解剖 肺组织广泛性实变(尤以左肺上叶下部, 下叶, 右肺全肺为重) 肺水肿, 肺出血, 肺灶性出血性梗死。病变的肺组织呈脱屑性间质性肺炎改变, 实变的肺泡腔内充满大量脱落和增生的肺泡上皮、水肿液、肺泡隔及肺泡腔内见数量不等的单核巨噬细胞及淋巴细胞浸润, 部分肺泡腔内、胸膜可见中性粒细胞浸润。双肺肺泡腔内广泛性透明膜形成伴局灶性肺泡壁坏死。部分肺泡上皮内检见病毒包涵体。肺支气管上皮脱落, 部分小支气管壁内及周围见有淋巴细胞、单

核细胞及中性粒细胞浸润。肺间质充血，出血，毛细血管扩张，腔内含单核细胞、淋巴细胞和中性粒细胞，肺间质小动脉及小静脉内皮细胞肿胀、增生，内皮下水肿，血管中膜及外膜可见单核细胞及淋巴细胞浸润，部分小血管内可见透明血栓。肺门淋巴结内血管高度扩张充血，皮、髓质分界不清，副皮质区有较多的单核样细胞，髓质内淋巴组织减少。胸腔积血 200ml，肺动脉主干血栓形成。

2.2 电镜检查

电镜结果显示，在 II 型肺泡上皮细胞内可见冠状病毒样颗粒（见图 1）。

2.3 序列测定与分析

发明人测定的 SARS 冠状病毒序列全长为 29760 个碱基，命名为 GZ02102003，以指明该序列是从一位死亡于 2003 年 2 月 10 日的患者肺组织标本中检出。经与 GeneBank 上登录的其它 SARS 冠状病毒全序列进行比对（至 2003 年 6 月 6 日止，共有 17 条 SARS 冠状病毒全序列登录在 GeneBank 上，其中序列 ZJ01 有多处明显错误，不能完成序列比对），发现该序列除存在少量的 SNP 外，多出一段 29 个核苷酸序列(CCTACTGGTTACCAACCTGAATGGAATAT)，序列比较结果参见表一。17 株 SARS 冠状病毒全序列比较。这 29 个核苷酸序列的存在完全改变了 ORF10 和 ORF11 的蛋白编码框，并且也存在于果子狸 SARS 病毒中，而从 2003 年 3 月后发病的病人体内检出的 SARS 冠状病毒均丢失了上述的 29 个核苷酸序列，显示这一株从 1 月份发病的患者体内分离测定的 SARS 冠状病毒与果子狸 SARS 冠状病毒存在高度的关联性。据此，发明人相信人类所感染的 SARS 病毒来源于果子狸。

表一. 17 株 SARS 冠状病毒全序列比较

备注：表一中仅表示出非同义变异。每一个核苷酸的位置是以 TOR2 SARS-CoV 序列为基础表示。氨基酸取代，相应蛋白质或者开放阅读框也表示出来。

	473	494	502	509	652	937	1180	1206	1384	1476	2601	3165	3274	3326	3626	4220	4250	4876	4952	5251	5427	5547	5591	5594	5681
TOR2	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
CUHK-SU10	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
SIN2748	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
SIN2500	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
HKU-39849	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	C	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
Urbani	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
TW1	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	G	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
SIN2677	T	T	A	G	G	A	G	T	C	G	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
SIN2774	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
ZJ01	G	A	T	G	G	A	G	T	M	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
SIN2679	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
BJ01	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
BJ03	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	C	T	T	A	T	T	T	C	C	C	C	C	G
BJ02	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	A	C	A	A	A	A	T
BJ04	T	T	A	G	G	A	T	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
CUHK-W1	T	T	A	G	G	A	G	T	C	A	T	A	A	T	T	A	T	T	T	C	A	A	A	A	G
GZ02102003	T	T	A	T	G	A	G	C	C	A	T	A	A	C	C	G	T	T	T	A	A	A	A	A	G

[illegible]

[illegible]

13500	14043	1499	15590	15593	15628	17137	17499	17540	17570	17804	17852	18070	18182	18288	18971	19070	19090	19844	20369	20454
T	T	A	A		C	T	C	T	T	C	C	G	C	C	T	A	C	A	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	T	C	T	G	C	C	T	A	C	A	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	T	C	C	G	C	C	T	A	T	A	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	T	C	C	G	C	C	T	A	T	A	G	G
G	T	A	A		C	T	C	T	T	C	C	A	C	C	T	A	C	A	G	G
T	T	A	A		T	T	C	T	T	C	C	G	C	C	T	G	C	A	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	T	C	C	G	C	C	T	A	C	A	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	T	C	C	G	C	C	T	A	T	A	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	T	C	C	G	C	C	A	A	C	A	G	G
T	A	T	-	T	C	T	T	A	T	C	C	G	C	C	T	A	C	A	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	T	C	C	G	C	A	T	A	C	A	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	G	C	C	G	C	C	T	A	C	G	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	G	C	C	G	C	C	T	A	C	G	T	G
T	T	A	A		C	T	C	T	G	T	C	G	C	C	T	A	C	G	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	G	C	C	G	C	C	T	A	C	G	G	G
T	T	A	A		C	T	C	T	G	C	T	G	C	C	T	G	C	A	G	G
T	T	A	A		C	C	C	T	G	C	C	G	C	C	T	A	C	A	G	G

[illegible]

22228	22428	22523	22528	22529	22530	22531	22532	22533	22534	22535	22536	22537	22538	22539	22540	22541	22542	22543	22544	22545	22546	22547	22548	22549	22550	22551	22552	22553	22554	22555	22556	22557	22558	22559	22560	22561	22562	22563	22564	22565	22566	22567	22568	22569	22570	22571	22572	22573	22574	22575	22576	22577	22578	22579	22580	22581	22582	22583	22584	22585	22586	22587	22588	22589	22590	22591	22592	22593	22594	22595	22596	22597	22598	22599	22600	22601	22602	22603	22604	22605	22606	22607	22608	22609	22610	22611	22612	22613	22614	22615	22616	22617	22618	22619	22620	22621	22622	22623	22624	22625	22626	22627	22628	22629	22630	22631	22632	22633	22634	22635	22636	22637	22638	22639	22640	22641	22642	22643	22644	22645	22646	22647	22648	22649	22650	22651	22652	22653	22654	22655	22656	22657	22658	22659	22660	22661	22662	22663	22664	22665	22666	22667	22668	22669	22670	22671	22672	22673	22674	22675	22676	22677	22678	22679	22680	22681	22682	22683	22684	22685	22686	22687	22688	22689	22690	22691	22692	22693	22694	22695	22696	22697	22698	22699	22700	22701	22702	22703	22704	22705	22706	22707	22708	22709	22710	22711	22712	22713	22714	22715	22716	22717	22718	22719	22720	22721	22722	22723	22724	22725	22726	22727	22728	22729	22730	22731	22732	22733	22734	22735	22736	22737	22738	22739	22740	22741	22742	22743	22744	22745	22746	22747	22748	22749	22750	22751	22752	22753	22754	22755	22756	22757	22758	22759	22760	22761	22762	22763	22764	22765	22766	22767	22768	22769	22770	22771	22772	22773	22774	22775	22776	22777	22778	22779	22780	22781	22782	22783	22784	22785	22786	22787	22788	22789	22790	22791	22792	22793	22794	22795	22796	22797	22798	22799	22800	22801	22802	22803	22804	22805	22806	22807	22808	22809	22810	22811	22812	22813	22814	22815	22816	22817	22818	22819	22820	22821	22822	22823	22824	22825	22826	22827	22828	22829	22830	22831	22832	22833	22834	22835	22836	22837	22838	22839	22840	22841	22842	22843	22844	22845	22846	22847	22848	22849	22850	22851	22852	22853	22854	22855	22856	22857	22858	22859	22860	22861	22862	22863	22864	22865	22866	22867	22868	22869	22870	22871	22872	22873	22874	22875	22876	22877	22878	22879	22880	22881	22882	22883	22884	22885	22886	22887	22888	22889	22890	22891	22892	22893	22894	22895	22896	22897	22898	22899	22900	22901	22902	22903	22904	22905	22906	22907	22908	22909	22910	22911	22912	22913	22914	22915	22916	22917	22918	22919	22920	22921	22922	22923	22924	22925	22926	22927	22928	22929	22930	22931	22932	22933	22934	22935	22936	22937	22938	22939	22940	22941	22942	22943	22944	22945	22946	22947	22948	22949	22950	22951	22952	22953	22954	22955	22956	22957	22958	22959	22960	22961	22962	22963	22964	22965	22966	22967	22968	22969	22970	22971	22972	22973	22974	22975	22976	22977	22978	22979	22980	22981	22982	22983	22984	22985	22986	22987	22988	22989	22990	22991	22992	22993	22994	22995	22996	22997	22998	22999	23000
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

[illegible]

22

509	G	G	377	1180	1205	1476	2601	3165	3274	3320	3626	4220	4876	4952	5251	5427	5548	5591	5594	5681	6168	6929	7746	7919	7930	8387	8417	8502	8539	8573	8816	8947	9096	9177	9405	9480	9833	10030	10324	10551	10589		
T0R2	G	G	A	G	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
HR-SL	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
IN274	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
IN250	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
CL-398	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
Urban	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
TVI	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
IN267	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
IN277	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
IN267	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
B001	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
B003	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
B002	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
B004	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
HR-W	G	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	A	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	G	A	A	
G201	T	A	C	G	T	A	T	A	A	T	C	G	T	T	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	G	C	T	C	T	T	T	T	C	C	G	A	A
G202	T	A	C	G	T	A	T	A	A	T	C	G	T	T	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T</													

序列分析的一个重要结果是 GZ02102003 所独有的 29 个碱基改变了 ORF10 和 11 的氨基酸编码, 结果如图 2A 和图 2B 所示。

发明人的方法的独特之处在于: 采用从该病人的尸解病变肺组织标本中直接建构总 cDNA 并用 SNP 测序方法测定 SARS 冠状病毒的全序列。

本研究最重要的发现在于检测到为这一病人所携带的 SARS 冠状病毒株所独有的 29 个核苷酸序列(CCTACTGGTTACCAACCTGAATGGAATAT, 见表 1)。这一发现的重要意义在于以下三个事实: 1) 这一段序列仅存在于发明人目前所能找到的最早的 SARS 死亡病人标本中, 其它完成全序列测定的 SARS 冠状病毒均来源于 2003 年 3 月份以后发病的病人且无一例外的丢失了这一段序列 (见表 1)。2) 这一段序列的存在完全改变了 ORF10 和 11(见图 2A 和图 2B)。3) 这一段序列同时存在于从野生动物果子狸体内分离到 SARS 冠状病毒。所以我们认为这段序列从果子狸到人体以及在人体上随时间的迁移规律使得我们有理由相信人类所感染的 SARS 病毒来源于果子狸。

附图简述

图 1 是病变肺组织超薄切片电镜观察。

图 2A 是 ORF10 和图 2B 是 ORF11 比较。

图 3 是 PCR 终产物。DNA Marker: 从下到上依次为 1.100bp; 2.250bp; 3.500bp; 4.750bp; 5.1000bp; 6.2000bp; 7.2500bp; 8.5000bp; 9.7500bp; 10.10000bp; 11.15000bp。PCR 片段: 从左到右依次为 S 全长; S1 片段; S2 片段; E 蛋白; M 蛋白; N 蛋白; PXN 片段。

图 4: 质粒 pMD18-T (由 Takara 公司提供)。

图 5: S1、S2、E、M、N、和 X2 的 pMD18-T 克隆图谱。

图 6: pcDNA3.1(+)/(−)图谱。

图 7: 酶切确认 pcDNA3.1(+)/(−) (S1、S2、E、M、N 和 X2) 克隆。

图 8A-8D 是本发明的部分核苷酸序列的抗原性实验结果。图 8A 中是只表达 S 蛋白 (刺突蛋白) 的腺病毒载体, S1。图 8B 中是表达 S 蛋白和 E 蛋白的腺病毒载体, S2。图 8C 中是表达 S 蛋白, M 蛋白和 E 蛋白的腺病毒载体, S3G。图 8D 中是表达 E 蛋白, M 蛋白和 N 蛋白的腺病毒载体, S3N。

图 9 是本发明的部分核苷酸序列的抗原性实验结果。实验采用表达 S 蛋白, M 蛋白和 E 蛋白的腺病毒载体, 即 S3G 作为疫苗进行; 用 PBS 作为对照。

具体实施方式

下面以实施例的方式对本发明进行说明, 但是正如本技术领域的技术人员所理解的那样, 这些实施例仅仅用于说明本发明而不是为了限定本发明。本发明仅仅受所附权利要求的限制。

实施例 1. SARS 病毒基因片段的获取

SARS 病毒 RNA 提取

1.1 材料

1.1.2 含 SARS 病毒的肺组织：取自广东省一位因感染 SARS 而死亡的女患者。

1.2.3 TRIZOL Reagent：购自 GIBCOBRL 公司，为总 RNA 提取试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 取冻存于 -80°C 冰箱中的患者肺组织约 100mg，置于洁净的玻璃研钵中研碎。

1.2.2 取出 1ml TRIZOL 试剂置于玻璃研钵中，轻轻吹打，使研碎的肺组织溶于 TRIZOL 试剂后，用 1.5ml 离心管收集。

1.2.3 将离心管置于室温中 5 分钟，向离心管中加入 0.2ml 氯仿，用手剧烈振荡后，再将离心管置于室温中 3 分钟。

1.2.4 4°C 离心 15 分钟，12000g/分钟。

1.2.5 收集离心后含 RNA 的上层水相，加入 0.5ml 异丙醇，室温放置 15 分钟。

1.2.6 4°C 离心 10 分钟，12000g/分钟。

1.2.7 去掉上清，用 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀物一次。

1.2.8 待 RNA 沉淀物在空气中晾至微干后，加入 50ml 无 RNA 酶污染的无菌水溶解。

cDNA 合成

2.1 材料

2.1.1 cDNA 合成试剂盒：RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1，购自宝生物公司。

2.1.2 SARS RNA：由南方医院感染内科提取。

2.2 方法

2.2.1 反应混合物

MgCl	4.0 μl
缓冲液	2.0 μl
dNTP	2.0 μl
RNAase 抑制剂	0.5 μl
Random 引物	1.0 μl
Orligo dT 引物	1.0 μl
RNA 模板	1.0 μl
Transcriptase 酶	1.0 μl
水	7.5 μl

2.2.2 反应程序

第 1 步： 37°C 孵育 50 分钟

第 2 步： 50°C 孵育 2 分钟

第3步: 37℃ 孵育 5 分钟

第4步: 重复第2步、第3步 5 次

第5步: 95℃ 孵育 3 分钟

PCR 扩增

3.1 材料

3.1.1 PCR 试剂盒: KaTaRa Ex Taq, 购自宝生物公司

3.1.2 cDNA 由本公司自行合成

3.2 方法

3.2.1 反应混合物

10X Ex Taq 缓冲液	1.0μl
dNTP 混合物	0.8μl
cDNA 模板	1.0μl
随机引物	0.5μl
随机引物	0.5μl
Taq 酶	0.05μl
水	6.15μl

3.2.2 反应程序

第1步: 94℃ 孵育 3 分钟

第2步: 94℃ 孵育 30 秒钟

第3步: 58℃ 孵育 20 秒钟

第4步: 72℃ 孵育 40 秒钟 (注: 根据扩增片段的分子量大小, 孵育时间从 40 秒到 4 分钟不等。)

第5步: 重复第2步、第3步和第4步 34 次

第6步: 72℃ 孵育 5 分钟。

结果见图 3 中。

实施例 2. SARS 病毒相关抗原基因片段的克隆

一、6 个抗原基因片段的 PCR 扩增

所有的 PCR 引物 (见表二) 在设计时都带有 ATG (start codon), 并且所有的 PCR 产物都在 3' 末端有终止子 (stop codon), 这样就使得所有的片段在克隆到相关的载体后得到有效的表达。这些引物由华大基因上海鼎安生物科技有限公司合成, 分别按每个 OD 用 200ul 的 minipore 无菌水溶解后, 再稀释 5 倍后当成工作浓度, 在 PCR 反应时按 10X 使用。

用 Takara 公司提供的 PCR 试剂盒, PCR 的模板为 (pGEM T Easy clones) 相应 pGEM-T Easy 的克隆。PCR 反应的条件 1/10 体积的两个引物, 10~50ng 的模板, dNTP, 1/10 体积的 10 倍 PCR 缓冲液, 2 个单位的 Taq 酶, 加无菌水至工作体积 (10 到 25ul), PCR 的程序为 94℃ 4 分钟, 然后 94℃ 30 秒—58℃30 秒—72

℃ 2 分钟 30 秒的 30 个循环,之后再一个 72℃ 10 分钟。所做的 PCR 反应均用 Eppendorf 公司的 PCR 机器进行。

所得的 PCR 终产物如图 3 所示。

二、 6 个抗原基因片段 pMD18-T 克隆的构建

用 Qiagen 公司提供的 PCR Purification Kit 将以上所得的 PCR 产物分别纯化,继而与 pMD18-T (Takara 公司的 TA 克隆载体,见图 4) 按 2:1 到 5:1 范围的摩尔浓度比、10 到 20ul 的总体积、单位连接酶来进行连接,之后转化到 DH5 α 的感受态细胞,继而在有 100ug/ml Ampicillin 和 IPTG/X-gal 的 LB 培养基上挑选白色的菌落,分别将这些菌落用 4ml LB(100ug/ml Ampicillin)培养后提取质粒(用 Qiagen 公司的 miniprep extraction kit),继而进一步酶切(用 BamHI 和 EcoRI 来切 S1、S2、E、M 和 N 克隆,用 KpnI 和 EcoRI 来切 X2 克隆)来确定所得的克隆是否带有正确大小的插入片段(见图 5)。然后将有正确大小插入片段的克隆送到华大基因上海鼎安生物科技有限公司进行插入片段的测序,最终确定克隆片段的正确与否。

三、 6 个抗原基因片段 pcDNA3.1 克隆的构建

测序确证后的 S1、S2、E、M 和 N 等 5 个 pMD18-T 克隆,分别用 BamHI 和 EcoRI 酶切后,将样品跑电泳将插入的克隆片段和 pMD18-T 分离开,并用 Qiagen 公司的 gel extraction kit 来分离纯化相应的插入片段 S1、S2、E、M 和 N,最后将这些片段分别克隆到 BamHI 和 EcoRI 酶切并纯化后的 pcDNA3.1(+) (见图 6) 载体;而 X2pMD18-T 克隆则用 EcoRI 和 KpnI 来进行酶切,继而克隆到用 EcoRI 和 KpnI 来酶切并纯化后的 pcDNA3.1(-) (见图 6) 载体上。所得到的这些重组的 pcDNA3.1(+)/(+) (S1、S2、E、M、N 和 X2) 克隆(见图 7) 将作为 DNA 疫苗可能的候选,进行动物的试验来检验。

表 二: PCR 引物及相应的 PCR 反应的模板和对应的 PCR 产物

PCR 产物	引物	模板
S1 (~1980 bp)	E2-up-1: 5' ACA GGA TCC AAG AAC <u>ATG</u> TTT ATT TTC TTA TT 3' BamHI Start codon E2-down-1: 5' AGA TCT GAA <u>TTC</u> TAT CCA ATA GGA ATG TCG CAC TC 3' BgIII EcoRI	李进的 #1 pGEM-T Easy 的克隆
S2 (~1940 bp)	E2-up-2: 5' ATT GGA TCC ACC <u>ATG</u> GGC TGT CTT ATA GGA GCT GAG C 3' BamHI Start codon E2-down-2: 5' ATG GAT <u>CCG</u> AAT <u>TCT</u> GGC TGT GCA GTA ATT GAT CT 3' BamHI EcoRI	李进的 #2 pGEM-T Easy 的克隆
E (~300bp)	E-up: 5' CAA GGA TCC GTT <u>ATG</u> TAC TCA TTC GTT TCG 3' BamHI Start codon E-down: 5' ACA AGA TCT GAA <u>TTC</u> TTT AAG CTC CTC AAC GGT AA 3' BgIII EcoRI	李进的 #5 pGEM-T Easy 的克隆
M (~760 bp)	M-up: 5' ACA GGA TCC ATC <u>ATG</u> GCA GAC AAC GGT AC 3' BamHI Start codon M-down: 5' AAC AGA TCT GAA <u>TTC</u> GCA ATC CTG AAA GTC CTC ATA 3' BgIII EcoRI	李进的 #4 pGEM-T Easy 的克隆
N (~1315 bp)	N-up: 5' ATT GGA TCC GTC <u>ATG</u> GAC AAT AAC CAG AAT GGA GGA CG 3' BamHI Start codon N-down: 5' AAC AGA TCT GAA <u>TTC</u> ATT CTG CAC AAG	李进的 #3 pGEM-T Easy 的克隆

	AG 3'	
	<i>Bgl</i> II <i>Eco</i> RI	
X2	X2-up: 5' ACA CCA TGG AAT TCG ACA TGG CTA TTT CAC	李进的 #6 pGEM-T Easy 的克隆
(~380bp)	CGA AG 3'	
	<i>Nco</i> I <i>Eco</i> RI Start codon	
	X2-down: 5' CAG GTA CCG GAT CCA ATA TTG CAG CAG	
	TAC GCA C 3'	
	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> HI	

表三、6 个片段克隆的设计

目标克隆	插入基因来源	连接克隆用的 pcDNA3.1 载体
pcDNA3.1(+)-S1	BamHI/EcoRI 酶切的 S1 片段 (~1980 bp), 来源于 pMD18-T/S1	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(+)-S2	BamHI/EcoRI 酶切的 S2 片段 (~1940 bp), 来源于 pMD18-T/S2	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(+)-E	BamHI/EcoRI 酶切的 E 片段 (~300 bp), 来源于 pMD18-T/E	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(+)-M	BamHI/EcoRI 酶切的 M 片段 (~760 bp) pMD18-T/M	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(+)-N	BamHI/EcoRI 酶切的 N 片段 (~1315 bp) pMD18-T/N	BamHI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1(-)-X2	KpnI/EcoRI 酶切的 X2 片段 (~380 bp) pMD18-T/X2	KpnI/EcoRI 酶切的 pcDNA3.1(-)

实施例 3. 编码 SARS 冠状病毒 (CoV-SARS) 的 E 蛋白、M 蛋白、S 蛋白、X 蛋白和 N 蛋白的核苷酸序列的抗原性，用小鼠作实验

为了有效地控制 SARS 的发生发展，对该病毒疫苗的研究显得尤为重要。相对于常规的减毒、灭活疫苗来说目前为止，DNA 疫苗的优势是比较显著的，这种创新疫苗产品没有免疫原性，而且具有多效性，免疫作用时间长，制造和使用方便，贮藏运动简单，生产成本较低。对于有可能发生的 DNA 疫苗质粒整合到动物基因组中的现象目前也未见报导。

复合腺病毒载体系统被用于测定编码小包膜蛋白 (E)、小膜蛋白 (M)、刺突蛋白 (Spike) 或糖蛋白 (S) 和核壳蛋白 (N) 的核苷酸序列的抗原性。所有的腺病毒载体都含有 E3 和所有 E4 ORF6 缺失，除了 ORF6 之外。

本发明提供的 DNA 疫苗是以复合腺病毒载体系统为载体。在其中插入编码 SARS 病毒蛋白 S 的基因片段而构建成 S1 疫苗，在其中插入编码 SARS 病毒蛋白 S 和 E 的基因片段而构建成 S2 疫苗，插入编码 E、M 和 N 蛋白的基因片段而构建

成 S3N 疫苗, 在其中插入编码 S、E 和 M 蛋白的基因片段而构建成 S3G 疫苗。

用上述疫苗在小鼠中进行实验, 每个候选疫苗按照 $10^{8\text{th}}$ pfu 的剂量注射一组小鼠 (6 只)。接种后, 每两周取血样一次。用 ELISA 检测 S 蛋白、E 蛋白的抗体。

实验结果表示在图 8A-8D 中, 其中 S1 是只表达刺突蛋白的复合腺病毒载体 (图 8A); S2 是表达 S 蛋白和 E 蛋白的所述载体 (图 8B); S3G 是表达 S 蛋白、M 蛋白和 E 蛋白的所述载体 (图 8C); S3N 是表达 E 蛋白、M 蛋白和 N 蛋白的所述载体 (图 8D)。S2 裂解液是表达 S 蛋白和 E 蛋白的破裂的细胞。此细胞是转染了表达 S 蛋白和 E 蛋白的载体的人 A549 肺癌细胞。该细胞基质作为免疫目标, 用于包被 ELISA 板的孔。HC4 裂解液含有无关的抗原, 用作对照。

实施例 4. S3N 疫苗在鼠中的重复实验

采用前述方法制备的 S3N 疫苗进行重复实验, 以腹腔注射的接种途径进行。

实验材料

1. 本实验所用的动物为 C57 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 养于本实验室动物房, 12 小时昼夜交替。小鼠雌雄各半, 8 周大小, 首次取血时体重介于 19g 和 29g 之间。

2. SARS IgG 抗体 ELISA 检测盒购于北京华大吉比爱生物技术有限公司。

实验方法

1. 动物实验过程:

- 1) 给药: C57 小鼠, 8 周大小, 分 2 组, 每组十个。各组于 0 周和 8 周分别腹腔注射疫苗 S3N 和 PBS 对照。S3N 疫苗溶于 PBS, 至浓度为 10^8 pfu/ml PBS, 每只小鼠注射 0.5ml。
- 2) 血清制备: 分别于 0 周 (注射前)、2 周、4 周、6 周、8 周 (注射前)、10 周、12 周和 16 周, 眼眶取血约 100 μ l, 血样室温静置 1 小时, 离心制取血清, 血清样品存于 -20°C 待测。
- 3) 血清中 SARS 抗体检测:

本实验运用的抗 SARS 抗体 ELISA 检测技术是在北京华大吉比爱生物技术有限公司生产的 ELISA 检测试剂盒的基础上进行修改 Himani Bisht, Anjeanette Roberts, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. PNAS April 27, 2004, vol. 101 no. 17 6641-6646 ; 黄文林, 刘然义, 黄必军, 黄嘉凌。携带 Spike 基因片段的重组腺病毒的构建及其诱导抗 SARS-CoV 免疫反应。

2. 具体步骤:

- a. 试剂盒的每个试验孔和溶于 PBS (pH7.5) 的 5% BSA 在 37°C 环境中孵育 60 分钟。
- b. 用试剂盒所带洗液洗板 5 次后, 加入倍比稀释的血清样品 (1/50 稀释起) 和阴阳性对照物, 37°C 孵育 60 分钟。
- c. 用试剂盒所带洗液洗板 5 次后, 各孔加入下列混合物: 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 羊抗鼠 IgG-HRP + 0.2% tween 20 + 1% BSA 溶于 PBS, 37°C 孵育 60 分钟。
- d. 用试剂盒所带洗液+0.05% tween 20 洗板 5 次后, 按试剂盒说明进行显色反应。控制显色反应的时间(5-10 分钟)。
- e. 双波长测量, 450nm, 630nm

下表所列为 DNA SARS 疫苗的具体注射和取血日程:

分组	S3N	PBS	
注射前血清制备 1	01/16	01/16	
注射前血清制备 2	02/18	02/18	
第一次注射(week 0)	02/19	02/19	
第一次取血 (week 2)	03/03	03/03	
第二次取血(week 4)	03/17	03/17	ELISA 3 次血清样品
第三次取血(week 6)	03/31	03/31	
第四次取血 (week 8) preinjection	04/14	04/14	ELISA
第二次注射(week 8)	04/14	04/14	
第五次取血(week 10)	04/28	04/28	
第六次取血(week 12)	05/12	05/12	
第七次取血(week 14) 一半 处死	05/27	05/27	ELISA 8 次血清样品

实验结果

本实验用 ELISA 的方法检测第 0、4、8、10 和 12 周各小鼠血清中的抗 SARS IgG 的滴度, 在此各样品进行倍比稀释。所测结果如图所示, 结果表明 1. Ad-S3N 在注射后第四周既可诱导小鼠的体液免疫反应; 2. 第 8 周的 Ad-S3N 再次注射可加强小鼠的体液免疫反应, 滴度高达 3000。结果参见图 9。

实施例 5. 检测 SARS DNA 疫苗 S2, S3N, S3G 对大鼠的免疫作用

实验中的 DNA 疫苗是以腺病毒为载体, 在其中插入编码 SARS 病毒蛋白 S 和 E 的基因片段而构建成 S2 疫苗, 插入编码 E、M 和 N 蛋白的基因片段而构建成 S3N 疫苗, 在其中插入编码 S、E 和 M 蛋白的基因片段而构建成 S3G 疫苗。DNA 疫苗

有不同的接种方式，在此我们首先采用腹腔注射的接种途径。

实验目的：

检测 SARS DNA 疫苗 S2, S3(N), S3(G)对大鼠的免疫诱导作用。

实验材料：

1. 本实验所用的动物为 SD 大鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司，养于本实验室动物房，12 小时昼夜交替。大鼠为雄性，体重约 200g。

2. SARS IgG 抗体 ELISA 检测盒购于北京华大吉比爱生物技术有限公司。

实验方法：

1. 动物实验过程：

1) 给药：SD 大鼠，约 200g，雄性，分 4 组，3 个给药组每组 3 个，第四组为 PBS 注射组含一个大鼠。各组于 0 周和 8 周分别腹腔注射疫苗 S2, S3(N), S3(G) 和 PBS 对照。各种疫苗分别溶于 PBS，注射剂量为 10^9 pfu/只。

2) 血清制备：分别于 0 周（注射前）、4 周 8 周（注射前）、10 周、12 周和 16 周，剪尾取血约 200 μ l，血样室温静置 1 小时，离心制取血清，血清样品存于 -20 °C 待测。

3) 血清中 SARS 抗体检测：

本实验运用的 SARS 抗体 ELISA 检测技术是在北京华大吉比爱生物技术有限公司生产的 ELISA 检测试剂盒的基础上进行修改，参见前文。

2. 具体步骤：

a. 试剂盒的每个试验孔和溶于 PBS (pH 7.5) 的 5% BSA 在 37°C 环境中孵育 60 分钟。

b. 用试剂盒所带洗液洗板 5 次后，加入倍比稀释的血清样品（1/50 稀释起）和阴阳性对照物，37°C 孵育 60 分钟。

c. 用试剂盒所带洗液洗板 5 次后，各孔加入下列混合物：0.5 μ g/ml 羊抗大鼠 IgG-HRP + 0.2% tween 20 + 1% BSA 溶于 PBS，37°C 孵育 60 分钟。

d. 用试剂盒所带洗液 + 0.05% tween 20 洗板 5 次后，按试剂盒说明进行显色反应。控制显色反应的时间(5-10 分钟)。

e. 双波长测量，450nm, 630nm

下表所列为各 DNA SARS 疫苗的具体注射和取血日程：

分组	S2	S3N	S3G	PBS
注射前血清制备 1	04/08	04/08	04/08	04/08
第一次注射(week 0)	04/08	04/08	04/08	04/08
第一次取血 (week 4)	05/09	05/09	05/09	05/09
第二次取血+注射(week 8)	06/03	06/03	06/03	06/03
第三次取血(week 10)	06/17	06/17	06/17	06/17
第四次取血(week 12)	07/01	07/01	07/01	07/01

实验结果：

本实验用 ELISA 的方法检测第 0、4 周各大鼠血清中的抗 SARS IgG 的滴度，在此各样品进行倍比稀释。所测结果如图所示，结果表明 Ad-S3G 可诱导大鼠的体液免疫反应，第四周的滴度达到 200 以上。结果参见图 10。

权利要求

1. 一种分离的多核苷酸，选自下述序列：a. SEQ ID NO:1 的多核苷酸序列；
b. 具有至少 90% 的序列与 SEQ ID NO:1 的序列相同的天然多核苷酸序列；和，a) 或 b) 互补的多核苷酸序列。
2. 一种分离的多核苷酸序列，编码包含一段选自下列氨基酸序列的多肽：a. SEQ ID NO:8；b. 具有至少 90% 的序列与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列相同的天然氨基酸序列；c. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的生物活性片段；和，d. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的免疫原性片段。
3. 一种分离的多核苷酸，选自：a. 选自 SEQ ID NO:2-7 的多核苷酸序列；b. 具有至少 90% 的序列与选自 SEQ ID NO:2-7 的序列相同的天然多核苷酸序列；和，
c. 与 a) 或 b) 互补的多核苷酸序列。
4. 一种分离的多肽序列，包含选自下列氨基酸序列：a. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列；b. 具有至少 90% 的序列与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列相同的天然氨基酸序列；c. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的生物活性片段；和，d. SEQ ID NO:8 的氨基酸序列中的免疫原性片段。
5. 一种能够对 SARS 病毒产生免疫反应的分离的多肽片段，选自：a. 选自 SEQ ID NO:9-14 的多核苷酸序列；b. 具有至少 90% 的序列与选自 SEQ ID NO:9-14 的序列相同的天然多核苷酸序列。
6. 一种能与权利要求 4 所述的多肽特异结合的分离抗体。
7. 一种能与权利要求 5 所述的多肽特异结合的分离抗体。
8. 权利要求 6 中的分离抗体是单克隆抗体。
9. 权利要求 7 中的分离抗体是单克隆抗体。
10. 一种药物组合物，含有有效量的权利要求 4 所述的多肽，和药学上可接受的载体。
11. 一种药物组合物，含有有效量的权利要求 5 所述的多肽，和药学上可接受的载体。
12. 一种药物组合物，含有有效量的权利要求 1 所述的多核苷酸，和药学上可接受的载体。
13. 一种药物组合物，含有有效量的权利要求 2 所述的多核苷酸，和药学上可接受的载体。
14. 一种药物组合物，含有有效量的权利要求 3 所述的多核苷酸和药学上可接受的载体。
15. 一种药物组合物，含有与药学上可接受的载体相结合的权利要求 6 所述的抗体。
16. 一种药物组合物，含有与药学上可接受的载体相结合的权利要求 7 所述的抗体。

17. 一种药物组合物, 含有与药学上可接受的载体相结合的权利要求 8 所述的抗体。

18. 一种药物组合物, 含有与药学上可接受的载体相结合的权利要求 9 所述的抗体。

19. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的诊断试剂盒, 含有权利要求 1 所述的多核苷酸和药学上可接受的载体。

20. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的诊断试剂盒, 含有权利要求 2 所述的多核苷酸和药学上可接受的载体。

21. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的诊断试剂盒, 含有权利要求 3 所述的多核苷酸和药学上可接受的载体。

22. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的探针, 含有至少 20 个连续多核苷酸, 该序列与样品中的 SARS 病毒多核苷酸序列互补, 所述探针在该探针与 SARS 病毒多核苷酸之间形成杂交复合体的条件下, 特异性与 SARS 病毒多核苷酸杂交。

23. 一种用于检测样品中 SARS 病毒存在的探针, 含有 SEQ ID NO:15 的多核苷酸序列。

24. 一种检验样品中 SARS 病毒的多核苷酸的方法, 所述 SARS 病毒多核苷酸具有权利要求 1 所述的多核苷酸序列, 该方法包括: a. 用探针杂交样品, 此探针含有至少 20 个连续多核苷酸, 包含与样品中的 SARS 病毒多核苷酸序列互补的序列, 所述探针在该探针与 SARS 病毒多核苷酸之间形成杂交复合体的条件下, 特异性与 SARS 病毒多核苷酸杂交; 和, b. 检测所述杂交复合体存在与否, 如果存在, 可选择性检测所述杂交复合体的量。

25. 一种检验样品中 SARS 病毒的多核苷酸的方法, 所述 SARS 病毒多核苷酸具有权利要求 2 所述的多核苷酸序列, 该方法包括: a. 用探针杂交样品, 此探针含有至少 20 个连续多核苷酸, 包含与样品中的 SARS 病毒多核苷酸序列互补的序列, 所述探针在该探针与 SARS 病毒多核苷酸之间形成杂交复合体的条件下, 特异性与 SARS 病毒多核苷酸杂交; 和, b. 检测所述杂交复合体存在与否, 如果存在, 可选择性检测所述杂交复合体的量。

26. 一种检验样品中 SARS 病毒的多核苷酸的方法, 所述 SARS 病毒多核苷酸具有权利要求 3 所述的多核苷酸序列, 该方法包括: a. 用探针杂交样品, 此探针含有至少 20 个连续多核苷酸, 包含与样品中的 SARS 病毒多核苷酸序列互补的序列, 所述探针在该探针与 SARS 病毒多核苷酸之间形成杂交复合体的条件下, 特异性与 SARS 病毒多核苷酸杂交; 和, b. 检测所述杂交复合体存在与否, 如果存在, 可选择性检测所述杂交复合体的量。

27. 权利要求 24 所述的方法, 其中探针含有至少 30 个连续的核苷酸。

28. 权利要求 25 所述的方法, 其中探针含有至少 30 个连续的核苷酸。

29. 权利要求 26 所述的方法, 其中探针含有至少 30 个连续的核苷酸。

30. 权利要求 24 所述的方法, 其中探针含有至少 50 个连续的核苷酸。

31. 权利要求 25 所述的方法, 其中探针含有至少 50 个连续的核苷酸。

32. 权利要求 26 所述的方法, 其中探针含有至少 50 个连续的核苷酸。

33. 一种检测生物样品中编码 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的方法, 包括以下步骤: a. 上述第 1 项的多核苷酸与生物样品中的核酸物质杂交, 形成杂交复合体; 和, b. 检测所述杂交复合体, 其中所述杂交复合体的存在与所述生物样品中编码 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的存在相关。

34. 一种检测生物样品中编码 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的方法, 包括以下步骤: a. 权利要求 2 所述的多核苷酸与生物样品中的核酸物质杂交, 形成杂交复合体; 和, b. 检测所述杂交复合体, 其中所述杂交复合体的存在与编码所述生物样品中 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的存在相关。

35. 一种检测生物样品中编码 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的方法, 包括以下步骤: a. 权利要求 3 所述的多核苷酸与生物样品中的核酸物质杂交, 形成杂交复合体; 和, b. 检测所述杂交复合体, 其中所述杂交复合体的存在与编码所述生物样品中 SARS 病毒蛋白质的多核苷酸的存在相关。

36. 一种有效抵抗人 SARS 病毒感染的疫苗, 包含具有选自 SEQ ID NO:1-7 的序列的肽, 和药学上可接受的载体。

37. 一种有效抵抗人 SARS 病毒感染的疫苗, 包含具有选自 SEQ ID NO:8-14 的序列的肽, 和药学上可接受的载体。

38. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒, 包括:

a. 腺病毒, 其中它的序列中负责复制的部分已被删除, 因此裂解此腺病毒不能复制它自身; 和

c. 至少一个多肽片段, 选自刺突蛋白、小膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白。

39. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒, 包括:

a. 腺病毒, 其中它的序列中负责复制的部分已被删除, 因此裂解此腺病毒不能复制它自身; 和

b. 两个多肽片段, 选自刺突蛋白、小膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白。

40. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒, 包括:

a. 腺病毒, 其中它的序列中负责复制的部分已被删除, 因此裂解此腺病毒不能复制它自身; 和

b. 三个多肽片段, 选自刺突蛋白、小膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白。

41. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒, 包括:

a. 腺病毒, 其中它的序列中负责复制的部分已被删除, 因此裂解此腺病毒不能复制它自身; 和

b. 多个多肽片段, 选自刺突蛋白、小膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白。

42. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒, 包括:

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；

d. SARS 病毒的刺突蛋白；和

e. 小包膜蛋白。

43. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；

d. SARS 病毒的刺突蛋白；和

e. 小膜蛋白。

44. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；

e. SARS 病毒的刺突蛋白；

f. 小膜蛋白；和

g. 小包膜蛋白。

45. 一种表达 SARS 病毒蛋白质的重组腺病毒，包括：

a. 腺病毒，其中它的序列中负责复制的部分已被删除，因此裂解此腺病毒不能复制它自身；

e. 小包膜蛋白；

f. 小膜蛋白；和

g. 核衣壳蛋白。

46. 一种 SARS 疫苗，含有权利要求 38 所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

47. 一种 SARS 疫苗，含有权利要求 39 所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

48. 一种 SARS 疫苗，含有权利要求 40 所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

49. 一种 SARS 疫苗，含有权利要求 41 所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

50. 一种 SARS 疫苗，含有权利要求 42 所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

51. 一种 SARS 疫苗，含有权利要求 43 所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

52. 一种 SARS 疫苗，含有权利要求 44 所述的重组腺病毒，和药学上可接受的载体。

53. 一种 SARS 疫苗，含有权利要求 45 所述的重组腺病毒，和药学上可接受

的载体。

54. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的权利要求 46 所述的疫苗。

55. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的权利要求 47 所述的疫苗。

56. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的权利要求 48 所述的疫苗。

57. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的权利要求 49 所述的疫苗。

58. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的权利要求 50 所述的疫苗。

59. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的权利要求 51 所述的疫苗。

60. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的权利要求 52 所述的疫苗。

61. 一种调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法, 包含施用有效量的权利要求 53 所述的疫苗。

62. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 46 所述的疫苗。

63. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 47 所述的疫苗。

64. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 48 所述的疫苗。

65. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 49 所述的疫苗。

66. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 50 所述的疫苗。

67. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 51 所述的疫苗。

68. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 52 所述的疫苗。

69. 一种免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 52 所述的疫苗。

70. 权利要求 62 所述的方法, 其中所述受试者是人类。

71. 权利要求 63 所述的方法, 其中所述受试者是人类。

72. 权利要求 64 所述的方法, 其中所述受试者是人类。

73. 权利要求 65 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
74. 权利要求 66 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
75. 权利要求 67 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
76. 权利要求 68 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
77. 权利要求 69 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
78. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 46 所述的疫苗。
79. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 47 所述的疫苗。
80. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 48 所述的疫苗。
81. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 49 所述的疫苗。
82. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 50 所述的疫苗。
83. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 51 所述的疫苗。
84. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 52 所述的疫苗。
85. 一种治疗受试者 SARS 病毒感染的方法, 包含给所述受试者施用权利要求 53 所述的疫苗。
86. 权利要求 78 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
87. 权利要求 79 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
88. 权利要求 80 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
89. 权利要求 81 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
90. 权利要求 82 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
91. 权利要求 83 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
92. 权利要求 84 所述的方法, 其中所述受试者是人类。
93. 权利要求 85 所述的方法, 其中所述受试者是人类。

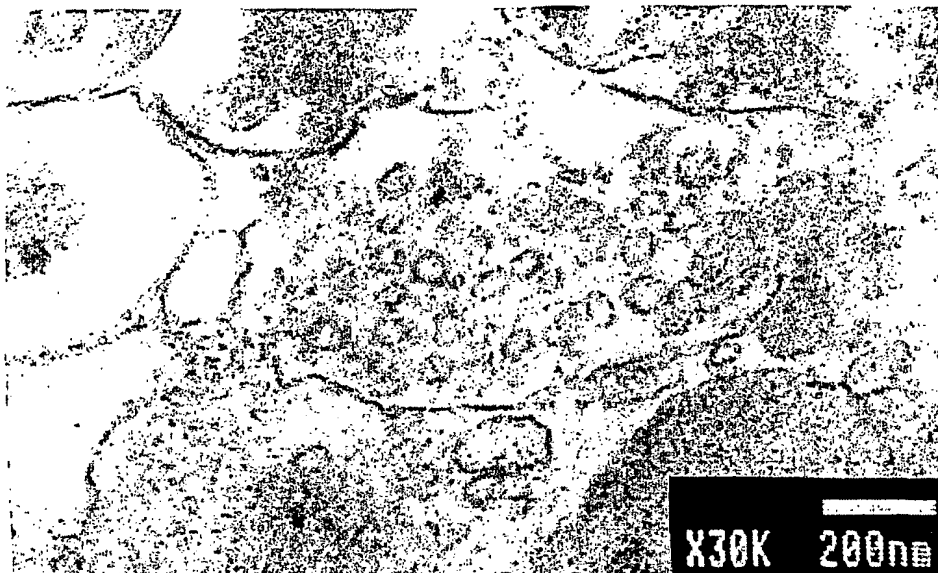


图1

10	20	30	40	50	60	
MKLLIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						TOR2
MKLLIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						CUHK-Su10
MKLLIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						HKU-39849
MKLLIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						Urbani
MKLLIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						TW1
M??LIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						SIN2677
MKLLIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						SIN2774
MKLLIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						SIN2500
MKLLIVLTCI??CSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						SIN2748
MKLLIVLTCISLCSCICTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						SIN2679
MKLLIVLTCISLCSCIRTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						BJ01
MKLLIVLTCISLCSCIRTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						BJ03
MKLLIVLTCISLCSCIRTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						BJ02
MKLLIVLTCISLCSCIRTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						BJ04
MKLLIVLTCISLCSCIRTVVQRCASNKPHVLEDPCKVQH*						CUHK-W1
MKLLIVLTCISLCSCIRTVVQRCASNKPHVLEDPCPTGYQPEWNIRYNTRGNTYSTAWLC						GZ02102003
70	80	90	100	110	120	
ALGKVLFPFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTAAFRDVFVVLNKRNTN*						GZ02102003

图2A

MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* TOR2
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* CUHK-Su10
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* HKU-39849
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* Urbani
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* TW1
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* SIN2677
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* SIN2774
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* SIN2500
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* SIN2748
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* SIN2679
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* BJ01
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* BJ03
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* BJ02
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* BJ04
MCLKILVRYNTRGNTYSTAWLCALGKVL PFHRWHTMVQTCTPNVTINCQDPAGGALIARCWYLHEGHQTA AFRDVLVVLNKRTN* CUHK-W1

MCLKILVLLVTNLNGI*GTTLGVILIALLG FVL*

GZ02102003

图 2B

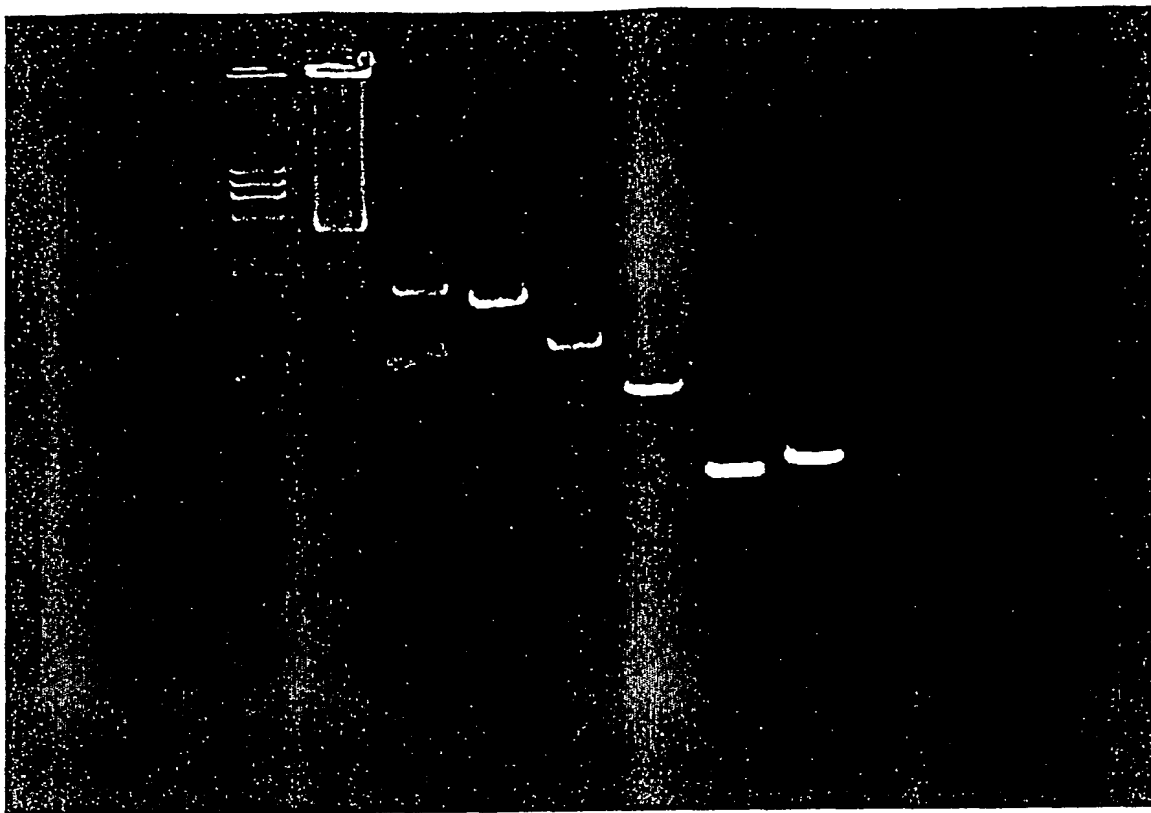


图 3

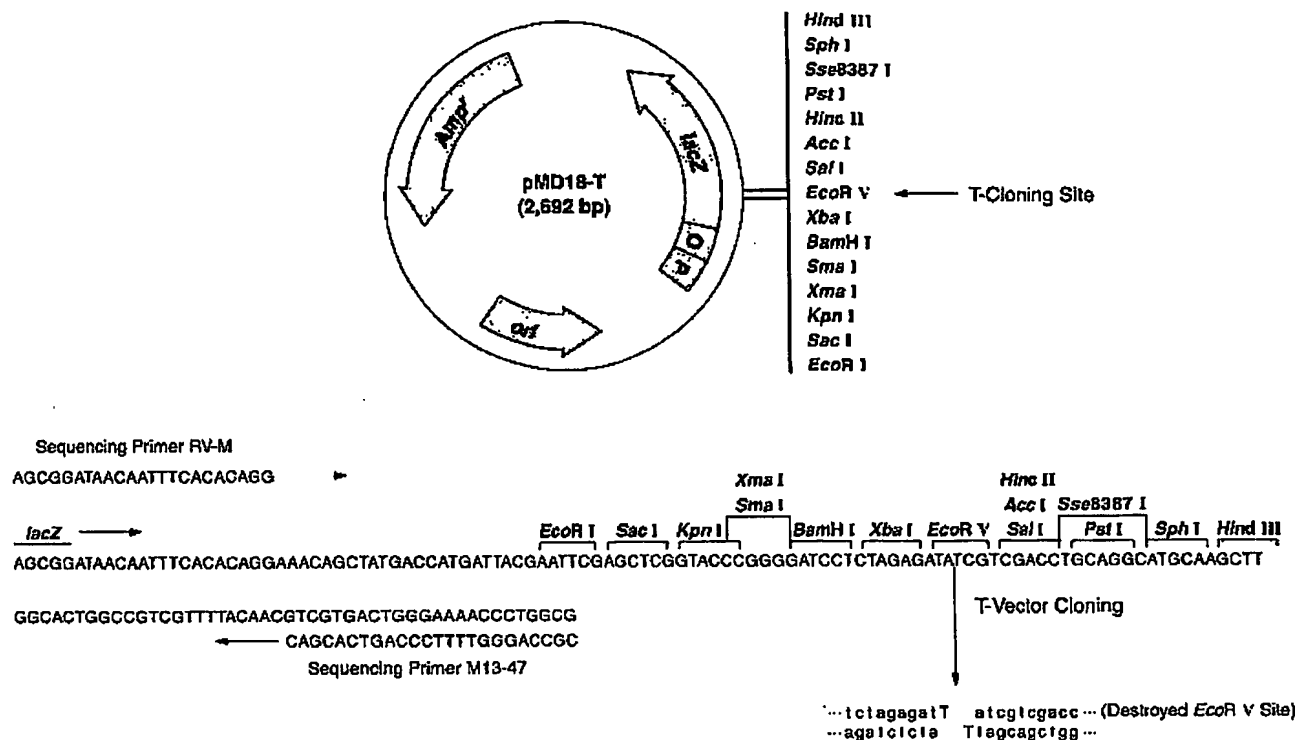
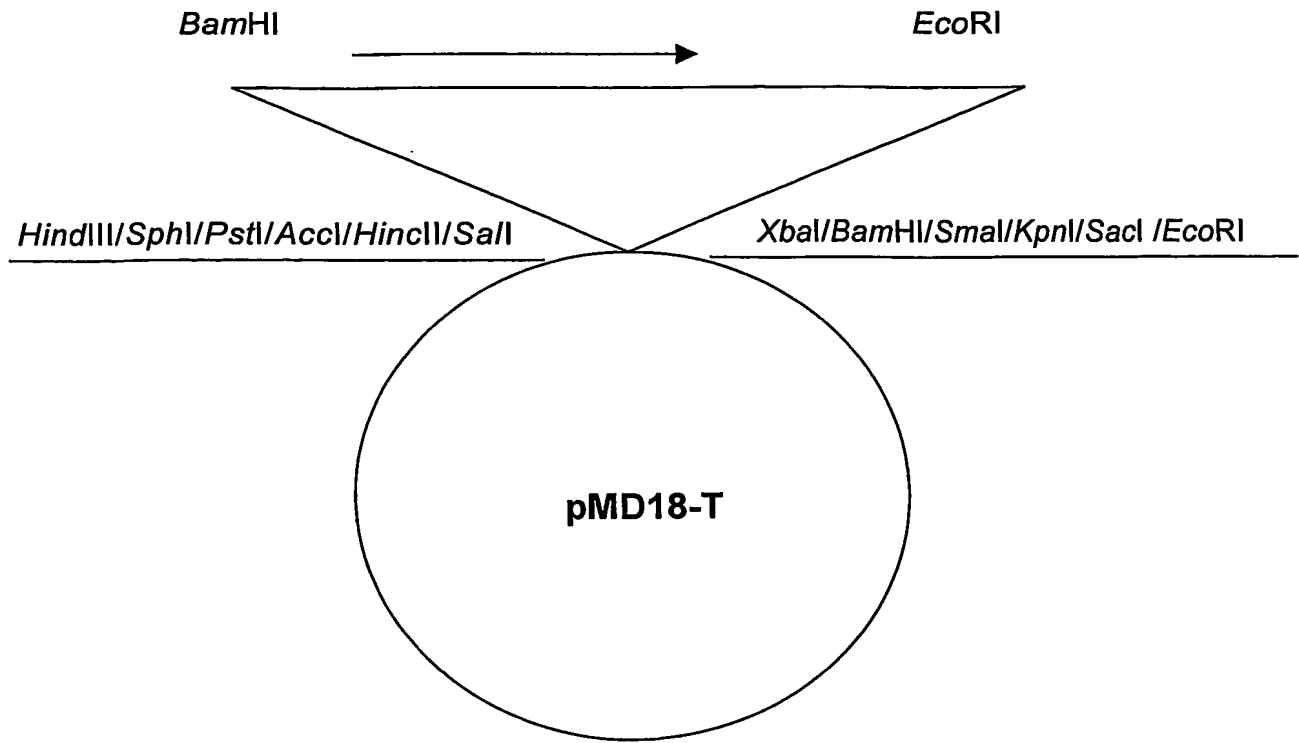
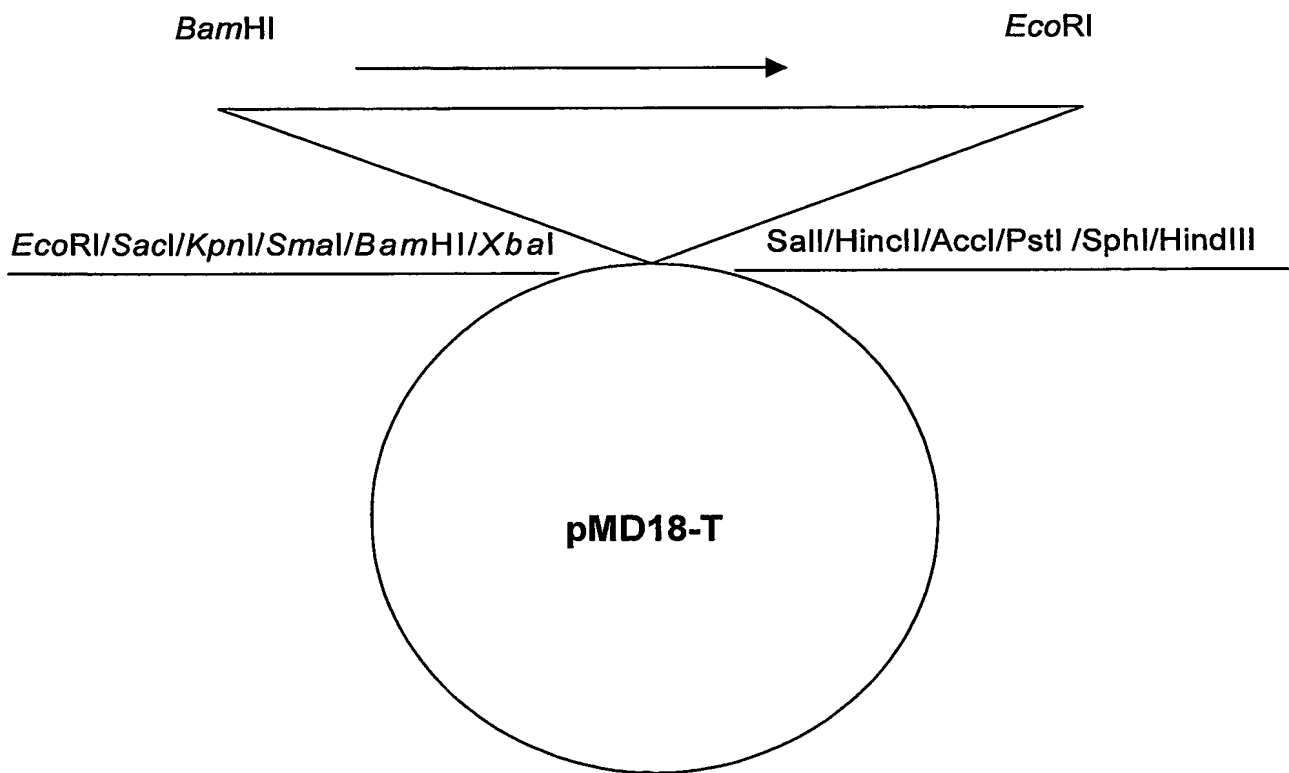


图 4



S1、S2、E、M 和 N 克隆示图



X2 pMD18-T 克隆示图

图 5

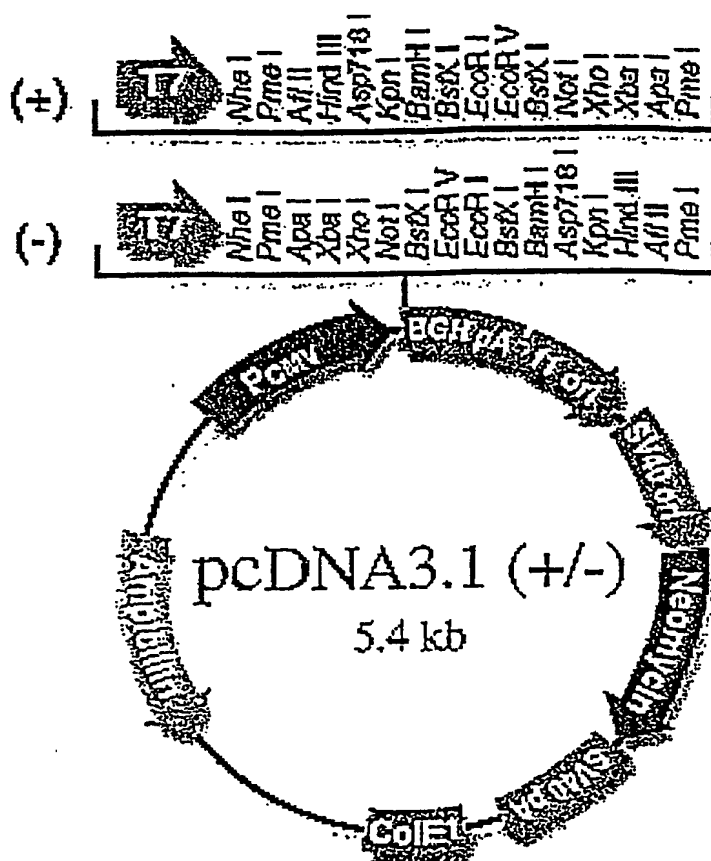
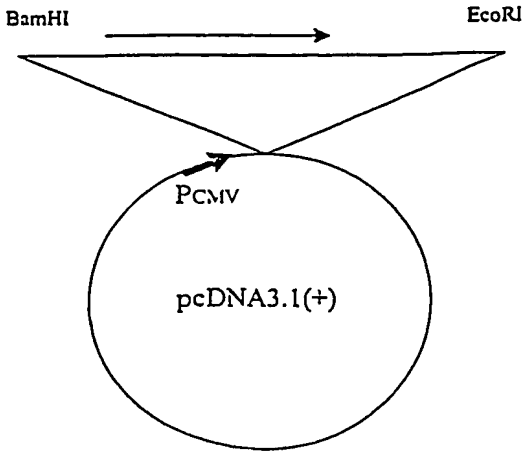
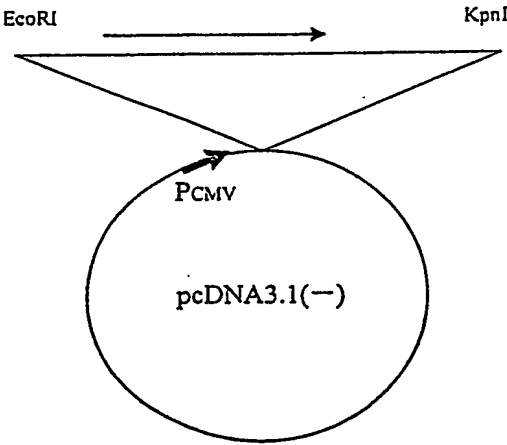


图 6



S1、S2、E、M pcDNA3.1 克隆示意图



X2 pcDNA3.1(-)克隆示意图

图 7

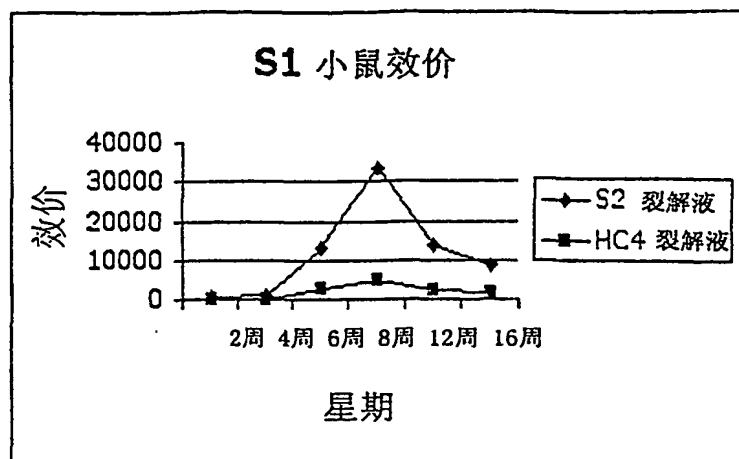


图8A

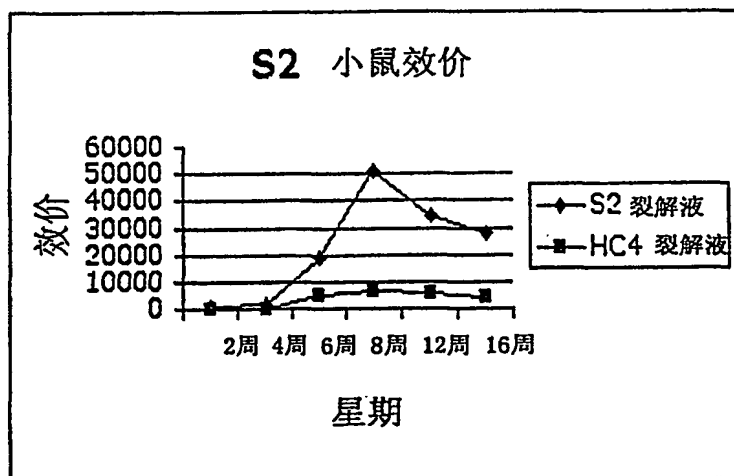


图8B

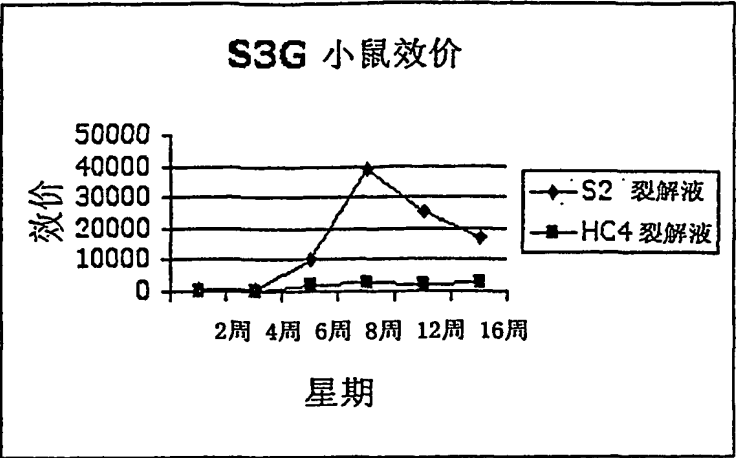


图8C

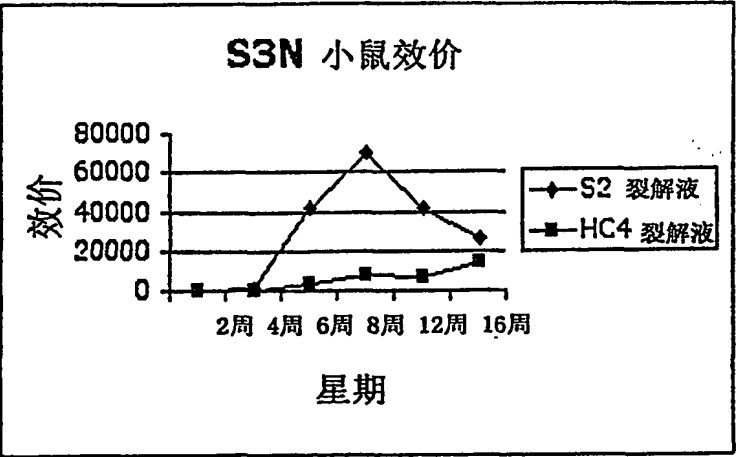


图8D

Ad-SARS蛋白诱导C57小鼠产生体液免疫

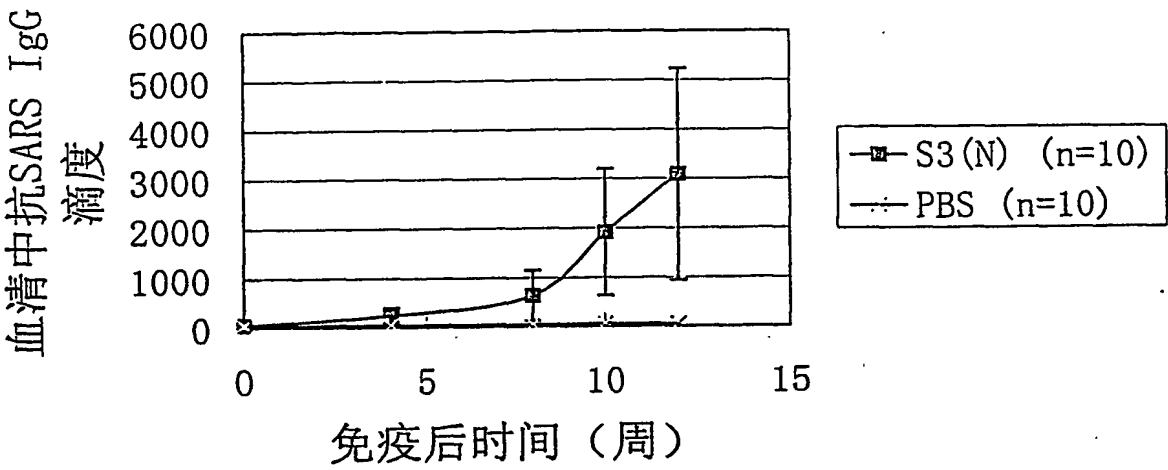


图 9

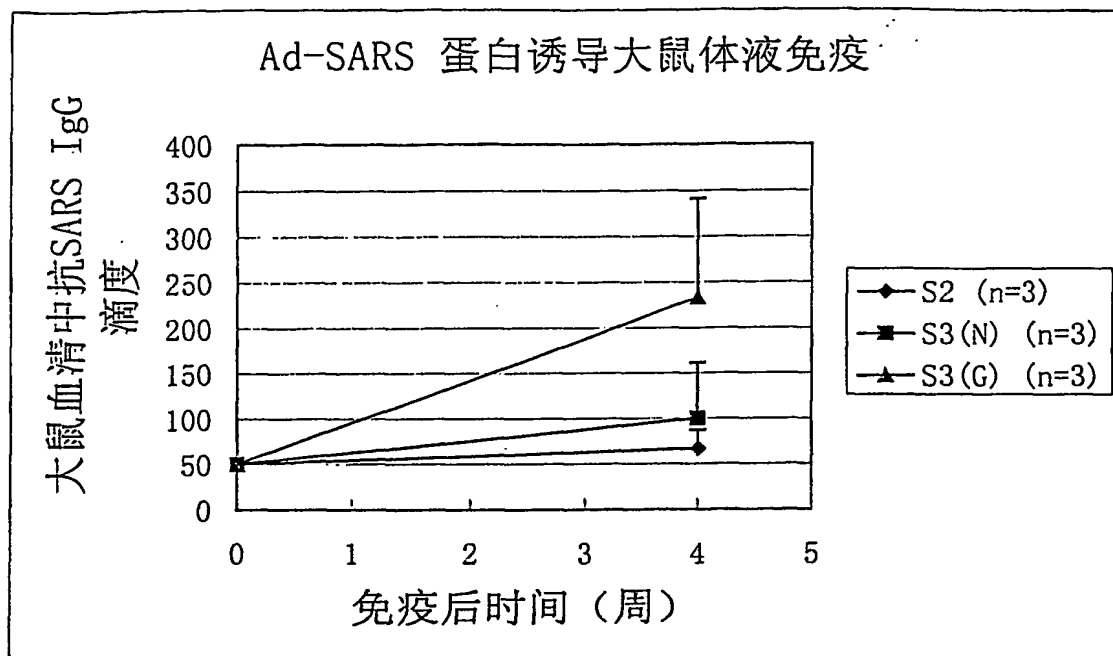


图 10

序列列表

<110> 深圳市清华源兴生物医药科技有限公司

<120> 抗SARS疫苗

<130> CGCNS41571

<150> CN03142873.8

<151> 2003-06-17

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29760

<212> DNA

<213> SARS 冠状病毒(SARS-CoV)

<400> 1

```
atattagggt ttacctacc caggaaaagc caaccaacct cgatctcttg tagatctgtt   60
ctctaaacga actttaaaat ctgtgtagct gtcgctcggc tgcagtccta gtgcacctac  120
gcagtataaa caataataaa ttttactgtc gttgacaaga aacgagtaac tcgtccctct  180
tctgcagact gcttacgggt tcgtccgtgt tgcagtcgat catcagcata cctaggtttc  240
gtccgggtgt gaccgaaagg taagatggag agccttggtc ttggtgtcaa cgagaaaaca  300
cacgtccaac tcagtttgcc tgccttcag gttagagacg tgctagtgcg tggcttcggg  360
gactctgtgg aagaggccct atcggaggca cgtgaacacc tcaaaaatgg cacttgtggt  420
ctagtagagc tggaaaaagg cgtactgcc cagcttgaac agccctatgt gttcattaa  480
cgttctgatg ccttaagcac caatcactgc cacaaggctg ttgagctggt tgcagaaatg  540
gacggcattc agtacggtcg tagcggata acactgggag tactcgtgcc acatgtgggc  600
gaaaccccaa tgcataccg caatgttctt cttcgtaaga acggaataa gggagccggt  660
```

ggtcatagct atggcatcga tctaaagtct tatgacttag gtgacgagct tggcactgat 720
 cccattgaag attatgaaca aaactggaac actaagcatg gcagtgggtgc actccgtgaa 780
 ctactcgtg agtcaatgg aggtgcagtc actcgctatg tcgacaacaa tttctgtggc 840
 ccagatgggt accctcttga ttgcatcaaa gattttctcg cacgcgcggg caagtcaatg 900
 tgactcttt ccgaacaact tgattacatc gagtcaaga gaggtgtcta ctgctgccgt 960
 gaccatgagc atgaaattgc ctggttcact gagcgtctg ataagagcta cgagcaccag 1020
 acacccttcg aaattaagag tgccaagaaa ttgacactt tcaaagggga atgccccaaag 1080
 tttgtgttc ctcttaactc aaaagtcaaa gtcatcaac cacgtgttga aaagaaaaag 1140
 actgagggtt tcatggggcg tatacgctct gtgtaccctg ttgcatctcc acaggagtgt 1200
 aacaacatgc acttgtctac ctgatgaaa tgtaatcatt gcgatgaagt tcatggcag 1260
 acgtgcgact ttctgaaagc cacttgtgaa cattgtggca ctgaaaattt agttattgaa 1320
 ggacctacta catgtgggta cctacctact aatgctgtag tgaaaatgcc atgtcctgcc 1380
 tgtcaagacc cagagattgg acctgagcat agtgttgagc attatcaca ccactcaaac 1440
 attgaaactc gactccgcaa gggaggtagg actagatgtt ttggaggctg tgtgtttgcc 1500
 tatgttggct gctataataa gcgtgcctac tgggttcctc gtgctagtgc tgatattggc 1560
 tcaggccata ctggcattac tggtgacaat gtggagacct tgaatgagga tctccttgag 1620
 atactgagtc gtgaacgtgt taacattaac attgttggcg attttcattt gaatgaagag 1680
 gttgccatca ttttggcatc tttctctgct tctacaagtg cctttattga cactataaag 1740
 agtcttgatt acaagtctt caaaaccatt gttgagtcct gcggttaacta taaagttacc 1800
 aagggaagc ccgtaaaagg tgcttgaac attggacaac agagatcagt ttaacacca 1860
 ctgtgtggtt ttcctcaca ggctgctggt gttatcagat caattttgc gcgcacactt 1920
 gatgcagcaa accactcaat tcctgatttg caaagagcag ctgtcaccat acttgatggt 1980
 atttctgaac agtcattacg tctgtcgac gccatggtt atacttcaga cctgctcacc 2040
 aacagtgtca ttattatggc atatgtaact ggtggtcttg tacaacagac ttctcagtg 2100
 ttgtctaac tttgggcac tactgttgaa aaactcaggc ctatctttga atggattgag 2160
 gcgaaacta gtgcaggagt tgaatttctc aaggatgctt gggagattct caaatttctc 2220
 attacagggtg ttttgacat cgtcaagggt caaatacagg ttgcttcaga taacatcaag 2280
 gattgtgtaa aatgcttcat tgatgtgtt aacaaggcac tcgaaatgtg cattgatcaa 2340
 gtcactatcg ctggcgcaaa gttgcgatca ctcaacttag gtgaagtctt catcgctcaa 2400
 agcaaggac tttaccgtca gtgtatacgt ggcaaggagc agctgcaact actcatgcct 2460
 ctaaggcac caaagaagt aaccttctt gaagggtgatt cacatgacac agtacttacc 2520
 tctgaggagg ttgttctcaa gaacggtgaa ctgaagcac tcgagacgcc cggtgatagc 2580

ttcacaatg gagctatcgt tggcacacca gtctgtgtaa atggcctcat gctcttagag 2640
attaaggaca aagaacaata ctgcgcattg tctcctggtt tactggctac aaacaatgtc 2700
tttcgcttaa aaggggggtgc accaattaaa ggtgtaacct ttggagaaga tactgtttgg 2760
gaagttcaag gttacaagaa tgtgagaatc acatttgagc ttgatgaacg tgttgacaaa 2820
gtgcttaatg aaaagtgtc tgtctacact gttgaatccg gtaccgaagt tactgagttt 2880
gcatgtgtg tagcagaggc tgttggaag actttacaac cagtttctga tctccttacc 2940
aacatgggta ttgatcttga tgagtggagt gtagctacat tctacttatt tgatgatgct 3000
ggtgaagaaa acttttcac acgtatgtat tgttccttt accctccaga tgaggaagaa 3060
gaggacgatg cagagtgtga ggaagaagaa attgatgaaa cctgtgaaca tgagtacggt 3120
acagaggatg attatcaagg tctccctctg gaatttggtg cctcagctga aacagttcga 3180
gttgaggaag aagaagagga agactggctg gatgatacta ctgagcaatc agagattgag 3240
ccagaaccag aacctacacc tgaagaacca gttaatcagt ttactggta ttaaaaactt 3300
actgacaatg ttgccattaa atgtgctgac atcgtaagg aggacaaaag tgctaactct 3360
atggtgattg taaatgctgc taacatacac ctgaaacatg gtggtggtgt agcagggtgca 3420
ctcaacaagg caaccaatgg tgccatgcaa aaggagatg atgattacat taagctaaat 3480
ggccctcta cagtaggagg gtcttggtt ctttctggac ataacttgc taagaagtgt 3540
ctgcatgtt ttggacctaa cctaaatgca ggtgaggaca tccagcttct taaggcagca 3600
tatgaaaatt tcaattcaca ggacacctta cttgcacat tgtgtcagc aggcatattt 3660
ggtgctaaac cacttcagtc ttacaagtg tgcgtgcaga cggttcgtac acaggtttat 3720
attgcagtca atgacaaagc tcttatgag caggtgtca tggattatct tgataacctg 3780
aagcctagag tggaagcacc taaacaagag gagccaccaa acacagaaga ttccaaaact 3840
gaggagaaat ctgtcgtaca gaagcctgtc gatgtgaagc caaaaattaa ggcctgcatt 3900
gatgaggta ccacaacact ggaagaaact aagtttcta ccaataagtt actctgttt 3960
gctgatatca atggtgaagct ttaccatgat tctcagaaca tgcttagagg tgaagatatg 4020
tcttccttg agaaggatgc accttacatg gtaggtgatg ttactactag tggatgatc 4080
acttggttg taataccctc caaaaaggct ggtggcacta ctgagatgct ctaagagct 4140
ttgaagaaag tgccagtga tgagtatata accacgtacc ctggacaagg atgtgctggt 4200
tatacactg aggaagctag gactgctctt aagaaatgca aatctgcatt ttatgtacta 4260
ccttcagaag cacctaagtc taaggaagag attctaggaa ctgtatcctg gaatttgaga 4320
gaaatgctg ctcatgctga agagacaaga aaattaatgc ctatatgcat ggatgttaga 4380
gccataatg caaccatcca acgtaagtat aaaggaatta aaattcaaga gggcatcgtt 4440

gactatggtg tccgattctt cttttatact agtaaagagc ctgtagcttc tattattacg 4500
aagctgaact ctctaaatga gccgcttgtc acaatgccaa ttggttatgt gacacatggt 4560
tttaatcttg aagaggctgc gcgctgtatg cgttctctta aagctcctgc cgtagtgtca 4620
gtatcatcac cagatgctgt tactacatat aatggatacc tcacttcgtc atcaaagaca 4680
tctgaggagc actttgtaga aacagtttct ttggctggct ctacagaga ttggctctat 4740
tcaggacagc gtacagagtt aggtgttgaa tttcttaagc gtggtgacaa aattgtgtac 4800
cacactctgg agagccccgt cgagtttcat ctgacggtg aggttcttc acttgacaaa 4860
ctaaagagtc tcttatccct gcgggaggtt aagactataa aagtgttcac aactgtggac 4920
aacactaatc tccacacaca gcttggtgat atgtctatga catatggaca gcagtttggg 4980
ccaacatact tggatggtgc tgatgttaca aaaattaac ctcagtataa tcatgagggt 5040
aagactttct ttgtactacc tagtcatgac acactacgta gtgaagcttt cgagtactac 5100
catactcttg atgagagttt tcttggtagg tacatgtctg ctttaaacca cacaagaaa 5160
tggaaatttc ctaagtgg tggtttaact tcaattaaat gggctgataa caattgttat 5220
ttgtctagt tttattagc acttcaacag attgaagtca aattcaatgc accagcactt 5280
caagaggctt attatagagc ccgtgctggt gatgctgcta acttttgtgc actcactc 5340
gcttacagta ataaaactgt tggcgagctt ggtgatgtca gagaaactat gacccatctt 5400
ctacagcatg ctaatttga atctgcaaag cgagttctta atgtggtgtg taaacattgt 5460
ggtcagaaaa ctactacctt aacgggtgta gaagctgtga tgtatatggg tactctatct 5520
tatgataatc ttaagacagg tgtttccatt ccatgtgtgt gtggtcgtga tgctacaca 5580
tatctagtac aacaagagtc ttctttgtt atgatgtctg caccacctgc tgagtataaa 5640
ttacagcaag gtacattctt atgtgcgaat gactacactg gtaactatca gtgtggtcat 5700
tacactcata taactgctaa ggagaccctc tatcgtattg acggagctca ccttacaag 5760
atgtcagagt acaaggacc agtgactgat gtttctaca aggaaacatc ttactacata 5820
accatcaagc ctgtgtcgt taaactcgat ggagttactt acacagagat tgaacaaaa 5880
ttggatgggt attataaaaa ggataatgct tactatacag agcagcctat agaccttgta 5940
ccaactcaac cattacaaa tgcgagtttt gataattca aactcacatg ttctaacaca 6000
aaatttgctg atgatttaaa tcaaatgaca ggcttcacaa agccagcttc acgagagcta 6060
tctgtcatc tcttccaga cttgaatggc gatgtagtgg ctattgacta tagacactat 6120
tcagcgagtt tcaagaaagg tgctaaatta ctgcataagc caattgttg gcacattaac 6180
caggctacaa ccaagacaac gttcaaacca aactttggt gtttacgttg tctttggagt 6240
acaaagccag tagatacttc aaattcattt gaagttctgg cagtagaaga cacacaagga 6300
atggacaatc ttgcttgtga aagtcaacaa cccacctctg aagaagtagt ggaaaatcct 6360

accatacaga aggaagtcac agagtgtgac gtgaaaacta ccgaagttgt aggcaatgtc 6420
atacttaaac catcagatga aggtgttaaa gtaacacaag agttaggtca tgaggatctt 6480
atggctgctt atgtggaaaa cacaagcatt accattaaga aacctaata gctttcacta 6540
gccttaggtt taaaaacaat tgccactcat ggtattgctg caattaatag tgttccttgg 6600
agtaaaattt ttgcttatgt caaaccattc ttaggacaag cagcaattac aacatcaa 6660
tgcgctaaga gattagcaca acgtgtgttt aacaattata tgccttatgt gtttacatta 6720
ttgttccaat tgtgtacttt tactaaaagt accaattcta gaattagagc ttactacct 6780
acaactattg ctaaaaatag tgtaagagt gttgctaaat tatgtttgga tgccggcatt 6840
aattatgtga agtcacccaa attttctaaa ttgttcacaa tcgctatgtg gctattgttg 6900
ttaagtattt gcttaggttc tctaactat gtaactgctg ctttggtgt actcttatct 6960
aattttggtg ctccttcta ttgtaatggc gttagagaat tgtatctaa ttcgtctaac 7020
gttactacta tggatttctg tgaaggttct tttccttgca gcattgttt aagtggatta 7080
gactcccttg attcttatcc agctcttgaa accattcagg tgacgatttc atcgtaacag 7140
ctagacttga caatttagg tctggccgct gagtgggttt tggcatatat gttgttcaca 7200
aaattctttt atttattagg tctttcagct ataatgcagg tgttcttgg ctattttgct 7260
agtcatttca tcagcaattc ttggctcatg tggtttatca ttagtattgt acaaatggca 7320
cccgtttctg caatggtag gatgtacatc ttctttgctt ctttctacta catatggaag 7380
agctatgttc atatcatgga tgggtgcacc tcttcgactt gcatgatgtg ctataagcgc 7440
aatcggtcca cagcggtga gtgtacaact attgttaatg gcatgaagag atctttctat 7500
gtctatgcaa atggaggccg tggcttctgc aagactcaca attggaattg tctcaattgt 7560
gacacatttt gactggtag tacattcatt agtgatgaag ttgctcgtga tttgtcactc 7620
cagtttaaaa gaccaatcaa ccctactgac cagtcacgt atattgttga tagtgttgct 7680
gtgaaaaatg gcgcgcttca ccttacttt gacaaggctg gtcaaaagac ctatgagaga 7740
catccgctct cccattttgt caatttagac aatttgagag ctaacaacac taaaggttca 7800
ctgcctatta atgtcatagt tttgatggc aagtccaaat gcgacgagtc tgcttctaag 7860
tctgcttctg tgtactacag tcagctgatg tgccaaccta ttctgttgct tgaccaagct 7920
cttgatcag acgttgagga tagtactgaa gttccgtta agatgtttga tgcttatgtc 7980
gacaccttt cagcaacttt tagtgttcct atggaaaaac ttaaggcact tgttgctaca 8040
gtcacagcg agttagcaaa ggggttagct ttagatggtg tctttctac attcgtgtca 8100
gctgcccagc aagggtgtgt tgataccgat gttgacacaa aggatgttat tgaatgtctc 8160
aaactttcac atcactctga cttagaagt acaggtgaca gttgtaacaa tttcatgctc 8220

acctataata aggttgaaaa catgacgccc agagatcttg gcgcatgtat tgactgtaat 8280
gcaaggcata tcaatgccca agtagcaaaa agtcacaatg ttctactcat ctggaatgta 8340
aaagactaca tgtctttatc tgaacagctg cgtaaacaaa ttcgtagtgc tgccaagaag 8400
aacaacatac cttttagact aacttggtct acaactagac aggttgtaa tgctataact 8460
actaaaatct cactcaaggg tggttaagatt gttagtactt ggtttaaact tatgcttaag 8520
gccacattat tegtgcgttct tgctgcattg gtttggtaca tcgttatgcc agtacatata 8580
ttgtcaatcc atgatggta cacaatgaa atcattggtt acaaagccat tcaggatggt 8640
gtcactcgtg acatcatttc tactgatgat tgttttgcaa ataaacatgc tggttttgac 8700
gcatggttta gccagcgtgg tggttcatat aaaaatgaca aaagctgccc ttagtagact 8760
gctatcatta caagagagat tggtttcata gtgcctggct taccgggtac tegtgtgaga 8820
gcaatcaatg tgacttctt gcattttcta cctcgtgttt ttagtgctgt tggcaacatt 8880
tgctacacac ctccaact cattgagtat agtgattttg ctactctgc ttgcgttctt 8940
gctgcagagt gtacaattt taaggatgct atgggcaaac ctgtgccata ttgttatgac 9000
actaattgc tagagggttc tatttcttat agtgagcttc gtccagacac tcgttatgtg 9060
cttatggatg gttccatcat acagtttctt aacatttacc tggagggttc tgttagagta 9120
gtaacaactt ttgatgctga gtactgtaga catggtacat gcgaaaggtc agaagcaggt 9180
attgcctat ctaccagtgg tagatgggtt cttaataatg agcattacag agctctatca 9240
ggagtttctt tggtgttga tgcgatgaat ctcatagcta acatctttac tcctcttggt 9300
caacctgtgg gtgctttaga tegtgtcgtc tcagtagtgg ctggtggtat tattgccata 9360
ttggtgactt gtgctgcta ctacttatg aaattcagac gtgcttttg tgagtacaac 9420
catgttggtg ctgtaatgc actttgttt ttgatgtctt tcactatact ctgtctggca 9480
ccagcttaca gctttctgcc gggagtctac tcagtctttt acttgactt gacattctat 9540
ttaccaatg atgtttcatt ctggctcac ctcaatggt ttgccatgtt ttctctatt 9600
gtgcctttt ggataacagc aatctatgta ttctgtattt ctctgaagca ctgccattgg 9660
ttctttaaca actatcttag gaaaagagtc atgtttaatg gagttacatt tagtaccttc 9720
gaggaggctg ctttgtgtac cttttgctc aacaaggaaa tgtacctaaa attgcgtagc 9780
gagacactgt tgccacttac acagtataac aggtatcttg ctctatataa caagtacaag 9840
tatttcagtg gagccttaga tactaccagc tatcgtgaag cagcttgctg ccacttagca 9900
aaggctctaa atgacttag caactcaggt gctgatgttc tctaccaacc accacagaca 9960
tcaatcactt ctgctgttct gcagagtggg ttaggaaaa tggcattccc gtcaggcaaa 10020
gttgaggat gcatggtaca agtaacctgt ggaactacaa ctctaatgg attgtggtg 10080
gatgacacag tatactgtcc aagacatgtc atttcacag cagaagacat gcttaatcct 10140

aactatgaag atctgctcat tcgcaaatcc aaccatagct ttcttggtca ggctggcaat 10200
gttcaacttc gtgttattgg ccattctatg caaaattgtc tgcttaggct taaagttgat 10260
acttctaacc ctaagacacc caagtataaa ttgtccgta tccaacctgg tcaaacattt 10320
tcagttctag catgctacaa tggttcacca tctgggtgtt atcagtggtc catgagacct 10380
aatcatacca ttaaagggtc ttctcttaat ggatcatgtg gtagtggtgg tttaacatt 10440
gattatgatt gcgtgtcttt ctgctatatg catcatatgg agcttcaac aggagtacac 10500
gctgggtactg acttagaagg taaattctat ggtccatttg ttgacagaca aactgcacag 10560
gctgcaggta cagacacaac cataacatta aatgttttgg catggctgta tgctgctgtt 10620
atcaatggtg atagggtggt tcttaataga ttcaccacta ctttgaatga cttaacctt 10680
gtggcaatga agtacaacta tgaaccttg acacaagatc atgttgacat attgggacct 10740
ctttctgctc aaacaggaat tgccgtctta gatatgtgtg ctgcttgaa agagctgctg 10800
cagaatggta tgaatggctg tactatcctt ggtagcacta ttttagaaga tgagtttaca 10860
ccatttgatg ttgttagaca atgctctggt gttaccttc aaggtaagtt caagaaaatt 10920
gttaagggca ctcatcattg gatgcttita actttctga catcactatt gattcttgtt 10980
caaagtacac agtgggtcact gtttttctt gtttacgaga atgctttctt gccatttact 11040
cttggtatta tggcaattgc tgcatgtgct atgctgcttg ttaagcataa gcacgcattc 11100
ttgtgctgtt ttctgttacc ttctcttgca acagttgctt actttaatat ggtctacatg 11160
cctgctagct gggtagtcg tatcatgaca tggcttgaat tggctgacac tagcttgtct 11220
ggttataggc ttaaggattg tgttatgtat gcttcagctt tagttttgct tattctcatg 11280
acagctcgca ctgtttatga tgatgctgct agacgtgtt ggacactgat gaatgtcatt 11340
acacttgttt acaaagtcta ctatggtaat gctttagatc aagctatttc catgtgggcc 11400
ttagttattt ctgtaacctc taactattct ggtgtcgta cgactatcat gtttttagct 11460
agagctatag tgtttgtgtg tgttgagtat taccattgt tattattac tggcaacacc 11520
ttacagtga tcatgctgtt ttattgttc ttaggtatt gttgctgctg ctacttggc 11580
ctttctgtt tactcaaccg ttacttcagg ctactctg gtgtttatga ctactgggc 11640
tctacacaag aatttaggta tatgaactcc caggggctt tgcctcctaa gagtagtatt 11700
gatgcttca agcttaacat taagttgttg ggtattggag gtaaaccatg tatcaagggt 11760
gctactgtac agtctaaaat gtctgacgta aagtgcacat ctgtgggtact gctctcggtt 11820
cttcaacaac ttagagtaga gtcacttctt aaattgtggg cacaatgtgt acaactccac 11880
aatgatattc ttctgcaaa agacacaact gaagcttctg agaagatggt ttctctttg 11940
tctgtttgc tatcatgca ggggtgctga gacattaata ggtgtgcga ggaaatgctc 12000

gataaccgtg ctactcttca ggctattgct tcagaattta gttctttacc atcatatgcc 12060
gcttatgcca ctgccagga ggcctatgag caggctgtag ctaatggtga ttctgaagtc 12120
gttctcaaaa agttaagaa atctttgaat gtggctaaat ctgagtttga ccgtgatgct 12180
gccatgcaac gcaagttgga aaagatggca gatcaggcta tgacccaaat gtacaaacag 12240
gcaagatctg aggacaagag ggcaaaagta actagtgcta tgcaacaat gctcttact 12300
atgcttagga agcttgataa tgatgcactt aacaacatta tcaacaatgc gcgtgatggt 12360
tgtgtccac tcaacatcat accattgact acagcagcca aactcatggt tgtgtccct 12420
gattatggtg cctacaagaa cacttgtgat ggtaacacct ttacatatgc atctgcactc 12480
tgggaaatcc agcaagttgt tgatgcggat agcaagattg ttcaacttag tgaaattaac 12540
atggacaatt caccaaattt ggcttggcct cttattgta cagctctaag agccaactca 12600
gctgttaaac tacagaataa tgaactgagt ccagtagcac tacgacagat gtcctgtgcg 12660
gctggtacca cacaacagc ttgtactgat gacaatgcac ttgcctacta taacaattcg 12720
aagggaggtg ggttgtgct ggcattacta tcagaccacc aagatctcaa atgggctaga 12780
ttccctaaga gtgatggtac aggtacaatt tacacagaac tggaaccacc tttagggtt 12840
gttacagaca cacaaaagg gcctaaagt aaatactgt acttcatcaa aggcttaaac 12900
aacctaaata gaggtatggt gctgggcagt ttagctgcta cagtacgtct tcaggctgga 12960
aatgctacag aagtacctgc caattcaact gtgcttctct tctgtgctt tgcatgtagac 13020
cctgctaaag catataagga ttacctagca agtggaggac aaccaatcac caactgtgtg 13080
aagatgttgt gtacacacac tggtagga caggcaatta ctgtaacacc agaagctaac 13140
atggaccaag agtcctttg tgggtgttca tgtgtctgt attgtagatg ccacattgac 13200
catccaaatc ctaaaggatt ctgtgacttg aaaggtaagt acgtccaaat acctaccact 13260
tgtgctaag acccagtggt tttacactt agaaacacag tctgtaccgt ctgcggaatg 13320
tggaagggtt atggctgtag ttgtgaccaa ctccgcgaac cttgatgca gtctgcggat 13380
gcatcaacgt ttttaaacgg gtttgcggtg taagtgcagc ccgtcttaca ccgtgcggca 13440
caggcactag tactgatgct gtctacaggg ctttgatat ttacaacgaa aaagttgctg 13500
gttttgcaa gttcctaaaa actaattgct gtcgcttcca ggagaaggat gaggaaggca 13560
atttattaga ctcttactt gtagttaaga ggcatactat gtctaactac caacatgaag 13620
agactattta taacttggtt aaagattgct cagcgggtgc tgtccatgac ttttcaagt 13680
ttagagtaga tggtagatg gtaccacata tatcacgtca gcgtctaact aaatacaca 13740
tggctgattt agtctatgct ctacgtcatt ttgatgagg taattgtgat acattaaaag 13800
aaatactcgt cacatacaat tgctgtgatg atgattatt caataagaag gattggtatg 13860
acttcgtaga gaatcctgac atcttacgcg tatatgctaa cttaggtgag cgtgtacgcc 13920

aatcattatt aaagactgta caattctgcg atgctatgcg tgatgcaggc attgtaggcg 13980
tactgacatt agataatcag gatcttaatg ggaactggta cgatttcggt gatttcgtac 14040
aagtagcacc aggctgcgga gttcctattg tggattcata ttactcattg ctgatgccc 14100
tcctcacttt gactagggca ttggctgctg agtcccatat ggatgctgat ctgcaaaac 14160
cacttattaa gtgggatttg ctgaaatag atttacgga agagagactt tgtctcttcg 14220
accgttattt taaatattgg gaccagacat accatcccaa ttgtattaac tgtttggatg 14280
ataggtgtat cttcattgt gcaaacttta atgtgttatt ttctactgtg tttcaccta 14340
caagttttgg accactagta agaaaaat ttgtagatgg tggtcctttt gttgttcaa 14400
ctggatacca ttttcgtgag ttaggagtcg tacataatca ggatgtaaac ttacatagct 14460
cgctctcag ttcaaggaa cttttagtgt atgctgctga tccagctatg catgcagctt 14520
ctggcaattt attgctagat aaacgcacta catgctttc agtagctgca ctaacaaaca 14580
atgttgcttt tcaaactgtc aaaccggta attttaataa agactttat gactttgctg 14640
tgtctaaagg tttcttaag gaaggaagtt ctgttgaact aaaacacttc ttcttgctc 14700
aggatggcaa cgctgctatc agtgattatg actattatcg ttataatctg ccaacaatgt 14760
gtgatatcag acaactccta ttcgtagttg aagttgtga taaatacttt gattgttacg 14820
atggtggctg tattaatgcc aaccaagtaa tcgttaacaa tctggataaa tcagctgggt 14880
tcccatttaa taaatggggg aaggctagac ttattatga ctcaatgagt tatgaggatc 14940
aagatgcact tttcgcgtat actaagcgta atgtcatccc tactataact caaatgaatc 15000
ttaagatgc cattagtgc aagaatagag ctgcaccgt agctgggtgc tctatctgta 15060
gtactatgac aaatagacag tttcatcaga aattattgaa gtcaatagcc gccactagag 15120
gagctactgt ggtaattgga acaagcaagt ttacgggtg ctggcataat atgttaaaaa 15180
ctgtttacag tgatgtagaa actccacacc ttatgggttg ggattatcca aaatgtgaca 15240
gagccatgcc taacatgctt aggataatgg cctctctgt tcttgctgc aaacataaca 15300
cttgctgtaa cttatcacac cgtttctaca ggtagctaa cgagtgtgcg caagtattaa 15360
gtgagatgg catgtgtggc ggctcactat atgttaaacc aggtggaaca tcatccggtg 15420
atgtacaac tgcttatgct aatagtgtct ttaacatttg tcaagctgtt acagccaatg 15480
taaatgcact tctttcaact gatggtaata agatagctga caagtatgtc cgcaatctac 15540
aacacaggct ctatgagtgt ctctatagaa atagggatgt tgatcatgaa ttcgtggatg 15600
agttttacgc ttacctgct aaacatttct ccatgatgat tctttctgat gatgccgttg 15660
tgtgctataa cagtaactat gcggctcaag gtttagtagc tagcattaag aactttaagg 15720
cagttcttta ttatcaaat aatgtgttca tgtctgaggc aaaatgttg actgagactg 15780

accttactaa aggacctcac gaattttgct cacagcatac aatgctagtt aaacaaggag 15840
atgattacgt gtacctgcct taccagatc catcaagaat attaggcgca ggctgttttg 15900
tcgatgatat tgtcaaaaca gatggtacac ttatgattga aaggttcgtg tcaactggcta 15960
ttgatgctta ccacttaca aaacatccta atcaggagta tgctgatgtc ttctacttgt 16020
atttacaata cattagaaag ttacatgatg agcttactgg ccacatgttg gacatgtatt 16080
ccgtaatgct aactaatgat aacacctcac ggtactggga acctgagttt tatgaggcta 16140
tgtacacacc acatacagtc ttgcaggctg taggtgcttg tgtattgtgc aattcacaga 16200
cttcaactcg ttgcggtgcc tgtattagga gaccattcct atgttgcaag tgctgctatg 16260
accatgtcat ttcaacatca cacaattag tggtgtctgt taatccctat gtttgcaatg 16320
ccccagggtg tgatgtcact gatgtgacac aactgtatct aggaggtagt agctattatt 16380
gcaagtcaca taagcctccc attagtttct cattatgtgc taatggtcag gtttttggtt 16440
tatacaaaaa cacatgtgta ggcagtgaca atgtcactga cttcaatgcg atagcaacat 16500
gtgattggac taatgctggc gattacatac ttgccaacac ttgtactgag agactcaagc 16560
ttttcgagc agaaacgctc aaagccactg aggaaacatt taagctgtca tatggtattg 16620
ccactgtacg cgaagtactc tctgacagag aattgcatct ttcatgggag gttggaaaac 16680
ctagaccacc attgaacaga aactatgtct ttactggta ccgtgtaact aaaaatagta 16740
aagtacagat tggagagtac accttgaaa aagggtgacta tgggtgatgct gttgtgtaca 16800
gagggtactac gacatacaag ttgaatgttg gtgattactt tegtgtgaca tctcactg 16860
taatgccact tagtgcacct actctagtgc cacaagagca ctatgtgaga attactggct 16920
tgtaccaac actcaacatc tcagatgagt ttctagcaa tgttgcaa atcaaaaagg 16980
tcggcatgca aaagtactct aactccaag gaccacctgg tactggtaag agtcattttg 17040
ccatcggtact tgctctctat taccatctg ctgcatagt gtatacgga tgctctcatg 17100
cagctgttga tgccctatgt gaaaaggcat caaaatattt gcccatagat aatgtagta 17160
gaatcatacc tgcgcgtgcg cgcgtagagt gtttgataa attcaaagt aattcaacac 17220
tagaacagta tgttttctgc actgtaaag cattgccaga aacaactgct gacattgtag 17280
tctttgatga aatctctatg gctactaatt atgacttgag tgtgtcaat gctagacttc 17340
gtgcaaaaca ctacgtctat attggcgatc ctgctcaatt accagcccc cgcacattgc 17400
tgactaaagg cacactagaa ccagaatatt ttaattcagt gtgcagactt atgaaaacaa 17460
taggtccaga catgttcctt ggaactgtc gccgtgtcc tgctgaaatt gttgacactg 17520
tgagtgtctt agtttatgac aataagctaa aagcacacaa ggagaagtca gctcaatgct 17580
tcaaaatgtt ctacaaagg gttattacac atgatgttc atctgcaatc aacagacctc 17640
aataggcgt tgtaagagaa ttcttacac gcaatcctgc ttggagaaaa gctgttttta 17700

tctcacctta taattcacag aacgctgtag cttcaaaaat cttaggattg cctacgcaga 17760
ctgttgattc atcacagggg tctgaatatg actatgtcat attcacacaa actactgaaa 17820
cagcacactc ttgtaatgtc aaccgcttca atgtggctat cacaagggca aaaattggca 17880
ttttgtgcat aatgtctgat agagatcttt atgacaaact gcaatttaca agtctagaaa 17940
taccacgtcg caatgtggct acattacaag cagaaaatgt aactggactt ttaaggact 18000
gtagtaagat cattactggg cttcatccta cacaggcacc tacacacctc agcgttgata 18060
taaagttcaa gactgaagga ttatgtgttg acataccagg cataccaaag gacatgacct 18120
accgtagact catctctatg atgggtttca aatgaatta ccaagtcaat ggttacccta 18180
atatgtttat caccgcgaa gaagctattc gtcacgttcg tgcgtggatt ggctttgatg 18240
tagagggctg tcatgcaact agagatgctg tgggtactaa cctacctc cagctaggat 18300
tttctacagg tgtaactta gtagctgtac cgactggta tgttgacact gaaaataaca 18360
cagaattcac cagagttaat gcaaacctc caccaggtga ccagtttaa catcttatac 18420
cactcatgta taaaggcttg ccctggaatg tagtgcgtat taagatagta caaatgtca 18480
gtgatacact gaaaggattg tcagacagag tcgtgttcgt cctttggcg catggctttg 18540
agcttacatc aatgaagtac ttgtcaaga ttggacctga aagaacgtgt tgtctgtgtg 18600
acaaacgtgc aactgcttt tctacttcat cagatactta tgctgtctg aatcattctg 18660
tgggtttga ctatgtctat aaccattta tgattgatgt tcagcagtgg ggctttacgg 18720
gtaacctta gagtaacct gaccaacatt gccaggtaca tggaaatgca catgtggcta 18780
gttgtgatgc tatcatgact agatgtttag cagccatga gtgctttgtt aagcgcgttg 18840
attggtctgt tgaataccct attataggag atgaactgag ggtaattct gcttcagaa 18900
aagtacaaca catggttgtg aagtctgcat tgctgtctga taagtttca gttcttcatg 18960
acattggaaa tccaaaggct atcaagtgtg tgcctcaggc tgaagtagaa tggaagttct 19020
acgatgtca gccatgtagt gacaaagctt acaaaataga ggaactctt tattcttatg 19080
ctacacatca cgataaattc actgatgggtg ttgtttgtt ttggaattgt aacgttgatc 19140
gttaccagc caatgcaatt gtgtgtaggt ttgacacaag agtctgtca aactgaact 19200
taccaggctg tgatgggtg agttgtatg tgaataagca tgcattccac actccagctt 19260
tcgataaaag tgcatttact aatttaaagc aattgcctt ctttactat tctgatagtc 19320
cttgtagtc tcatggcaaa caagtagtgt cggatattga ttatgttcca ctcaaactg 19380
ctacgtgtat tacacgatgc aatttaggtg gtgctgttg cagacaccat gcaatgagt 19440
accgacagta ctggatgca tataatatga tgattctgc tggatttagc ctatggattt 19500
acaaacaatt tgatacttat aacctgtgga atacatttac caggttacag agtttagaaa 19560

atgtggctta taatgttgtt aataaaggac actttgatgg acacgccggc gaagcacctg 19620
tttccatcat taataatgct gtttacacaa aggtagatgg tattgatgtg gagatctttg 19680
aaaataagac aacacttcct gttaatgttg catttgagct ttgggctaag cgtaacatta 19740
aaccagtgcc agagattaag atactcaata atttgggtgt tgatatcgct gctaatactg 19800
taatctggga ctacaaaaga gaagccccag cacatgtatc tacaataggt gtctgcacaa 19860
tgactgacat tgccaagaaa cctactgaga gtgctgttc ttacttact gtctgtttg 19920
atggtagagt ggaaggacag gtagacctt ttagaaacgc ccgtaatggt gtttaataa 19980
cagaaggctc agtcaaaggc ctaacacctt caaagggacc agcacaagct agcgtcaatg 20040
gagtcacatt aattggagaa tcagtaaaaa cacagttaa ctactttaag aaagtagacg 20100
gcattattca acagttgcct gaaacctact ttactcagag cagagactta gaggatttta 20160
agcccagatc acaaatggaa actgacttct tcgagctcgc tatggatgaa ttcatacagc 20220
gatataagct cgagggctat gccttcgaac acatcggtta tggagatttc agtcatggac 20280
aacttggcgg tcttcattta atgataggct tagccaagcg ctacaagat tcaccactta 20340
aattagagga tttatccct atggacagca cagtgaaaaa ttactcata acagatgcgc 20400
aaacaggctc atcaaatgt gtgtgtctg tgattgatct tttacttgat gacttgtcg 20460
agataataaa gtcacaagat ttgtcagtga tttcaaaagt ggtcaagggt acaattgact 20520
atgctgaaat ttcatcatg ctttgggtga aggatggaca tgttgaaacc ttctaccaa 20580
aactacaagc aagtcaagcg tggcaaccag gtgttgcgat gcctaactg tacaagatgc 20640
aaagaatgct tctgaaaag tggaccttc agaattatgg tgaatatgct gttatacaa 20700
aaggaataat gatgaatgc gaaagtata ctcaactgtg tcaatactta aatacactta 20760
cttagctgt accctacaac atgagagtta ttactttgg tgctggctct gataaaggag 20820
ttgcaccagg tacagctga ctacagacaat ggttgccaac tggcacacta cttgtcgatt 20880
cagatcttaa tgactcgtc tccgacgcag attctactt aattggagac tgtgcaacag 20940
tacatacggc taataaatgg gaccttatta ttagcgatat gtagaccct aagaccaaac 21000
atgtgacaaa agagaatgac tctaaagaag gggttttcac ttatctgtgt ggattataa 21060
agcaaaaact agccctgggt ggttctatag ctgtaaagat aacagagcat tcttggatg 21120
ctgacctta caagcttatg ggccatttct catggtggac agctttgtt acaaatgta 21180
atgcatcatc atcgaagca ttttaattg gggctaacta tcttgcaag ccgaaggaac 21240
aaattgatgg ctatacatg catgctaact acatttctg gaggaacaca aatcctatcc 21300
agttgtctc ctattcactc ttgacatga gcaaattcc tcttaatta agaggaactg 21360
ctgtaatgtc tcttaaggag aatcaaatca atgatgatg ttattctct ctggaaaaag 21420
gtaggcttat cattagagaa aacaacagag ttgtgttcc aagtgatatt cttgttaata 21480

actaaacgaa catgtttatt ttcttattat ttcttactct cactagtgg agtgaccttg 21540
accggtgcac cacttttgat gatgttcaag ctctaatta cactcaacat acttcatcta 21600
tgaggggggt ttactatcct gatgaaattt ttagatcaga cactctttat ttaactcagg 21660
atttatttct tccattttat tctaagtta cagggtttca tactattaat catacgtttg 21720
acaacctgt catacctttt aaggatggta ttattttgc tgccacagag aaatcaaag 21780
ttgtccgtgg ttgggtttt ggttctacca tgaacaaca gtcacagtcg gtgattatta 21840
ttaacaattc tactaatgtt gttatacag catgtaactt tgaattgtg gacaacctt 21900
tcttgctgt ttctaaacc atgggtacac agacacatac tatgatattc gataatgcat 21960
ttaattgcac ttctgagtag atactgtatg ccttttcgct tgatgtttca gaaaagtcag 22020
gtaattttaa acacttacga gagtttgtt taaaaataa agatgggtt ctctatgtt 22080
ataagggtta tcaacctata gatgtagttc gtgatctacc ttctgggtt aacacttga 22140
aaccatttt taagttgcct cttgttatta acattacaaa ttttagagcc attcttacag 22200
ccttttacc tgctcaagac acttggggca cgtcagctgc agcctattt gttggctatt 22260
taaagccaac tacatttatg ctcaagtatg atgaaatgg tacaacaca gatgctgttg 22320
attgttctca aaatccactt gctgaactca aatgctctgt taagagctt gagattgaca 22380
aaggaattta ccagacctt aatttcaggg ttgtccctc aagagatgt gtgagattcc 22440
ctaatttac aaacttgtt cttttggag aggtttta tgtactaaa ttcccttctg 22500
tctatgcatg ggagaggaaa agaatttcta attgtgtgc tgattactt gtgctctaca 22560
actcaacatt ttttcaacc ttaagtgt atggcggtt tgccactaag tgaatgatc 22620
tttgcttct caatgtctat gcagattctt ttgtagtcaa gggagatgat gtaagacaaa 22680
tagcgccagg acaaactgtt gttattgctg attataatta taaattgcca gatgatttca 22740
tggttgtgt cttgcttg aatactagga acattgatgc tacttcaact ggtaattata 22800
attataaata taggtatctt agacatggca agcttaggcc cttgagaga gacatatcta 22860
atgtgcctt cttccctgat ggcaaactt gcacccacc tgctctaat tgtattggc 22920
cattaaatga ttatgggtt tacaccacta ctggcattg ctaccaact tacagagtg 22980
tagtacttt tttgaactt taaatgcac cggccacgt ttgtggacca aaattatcca 23040
ctgacctat taagaaccag tgtgtcaatt ttaatttta tggactcact ggtactggg 23100
tgttaactcc ttctcaaag agatttcaac catttcaaca atttggcgt gatgtttctg 23160
atttactga ttccgttga gatcctaaaa catctgaaat attagacatt tcaccttgct 23220
ctttggggg tgtaagtga attacacctg gaacaaatgc tcatctgaa gttgctgtc 23280
tatatcaaga tgttaactgc actgatgtt ctacagcaat tcatgcagat caactcacac 23340

cagcttggcg catatattct actggaaca atgtattcca gactcaagca ggctgtctta 23400
taggagctga gcatgtcgac acttcttatg agtgcgacat tcctattgga gctggcattt 23460
gtgctagtta ccatacagtt tctttattac gtagtactag ccaaaaatct attgtggctt 23520
atactatgtc tttagggtgct gatagttcaa ttgcttactc taataacacc attgctatac 23580
ctactaactt ttcaattagc attactacag aagtaatgcc tgtttctatg gctaaaacct 23640
ccgtagattg taatatgtac atctgcggag atttactga atgtgctaatt ttgcttctcc 23700
aatatggtag cttttgcaca caactaaatc gtgcactctc aggtattgct gctgaacagg 23760
atcgcaacac acgtgaagtg ttgctcaag tcaaacaaat gtacaaaacc ccaactttga 23820
aagattttgg tggttttaat ttttcacaaa tattacctga ccctctaaag ccaactaaga 23880
ggctttttat tgaggacttg ctctttaata aggtgacact cgctgatgct ggcttcatga 23940
agcaatatgg cgaatgccta ggtgatatta atgctagaga tctcatttgt gcgcagaagt 24000
tcaatggact tacagtgttg ccacctctgc tactgatga tatgattgct gcctacactg 24060
ctgctctagt tagtggtagt gccactgctg gatggacatt tgggtgctggc gctgctcttc 24120
aaataccttt tgctatgcaa atggcatata ggttcaatgg cattggagtt acccaaaatg 24180
ttctctatga gaacaaaaaa caaatcgcca accaatttaa caaggcgatt agtcaaattc 24240
aagaatcact tacaacaaca tcaactgcat tgggcaagct gcaagacgtt gtaaccaga 24300
atgtcgaagc attaaacaca ctgttaaac aacttagctc taattttggt gcaatttcaa 24360
gtgtgctaaa tgatatcctt tcgcgacttg ataaagtcga ggcggaggta caaattgaca 24420
ggtaattac aggagactt caaagccttc aaacctatgt aacacaaca ctaatcaggg 24480
ctgctgaaat cagggcttct gctaactctg ctgctactaa aatgtctgag tgtgttcttg 24540
gacaatcaaa aagagttgac ttttgcggaa agggctacca cttatgtcc tcccacaag 24600
cagccccgca tgggtgttgc ttctacatg tcacgtatgt gccatcccag gagaggaact 24660
tcaccacagc gccagcaatt tgctatgaag gcazagcata ctccctctgt gaaggtgttt 24720
ttgtgtttaa tggcacttct tggtttatta cacagaggaa ctcttttct ccacaaataa 24780
ttactacaga caatacattt gtctcaggaa attgtgatgt cggtattggc atcattaaca 24840
acacagttta tgatcctctg caacctgagc ttgactcatt caaagaagag ctggacaagt 24900
acttcaaaaa tcatacatca ccagatgttg atcttggcga catttcaggc attaacgctt 24960
ctgtcgtcaa cattcaagaa gaaattgacc gcctcaatga ggtcgctaaa aatttaaag 25020
aatcactcat tgaccttcaa gaattgggaa aatatgagca atatattaaa tggccttggt 25080
atgtttggct cggcttcatt gctggactaa ttgcatcgt catgggtaca atcttgcttt 25140
gttgcatgac tagttgttgc agttgcctca agggtagctg ctcttggtgt tcttgctgca 25200
agtttgatga ggaatgactct gagccagttc tcaagggtgt caaattacat tacacataaa 25260

cgaacttatg gatttgttta tgagattttt tactcttgga tcaattactg cacagccagt 25320
aaaaattgac aatgcttctc ctgcaagtac tgttcatgct acagcaacga taccgctaca 25380
agcctcactc ccttcggat ggcttggtat tggcgttgca tttcttgctg ttttcagag 25440
cgctacaaaa ataattgagc tcaataaaag atggcagcta gccctttata agggcttcca 25500
gttcatttgc aatttactgc tgctatttgt taccatctat tcacatcttt tgcttgctgc 25560
tgcaggatg gaggcgcaat tttgtacct ctatgcctg atatatttc tacaatgcat 25620
caacgcatgt agaattatta tgagatgttg gcttggttg aagtgc aaat ccaagaaccc 25680
attactttat gatgccaaact acttggttg ctggcacaca cataactatg actactgtat 25740
accatataac agtgtcacag atacaattgt cggtactgca ggtgacggca tttcaacacc 25800
aaaactcaaa gaagactacc aaattgggtg ttattctgag gattggcact cagggtgtaa 25860
agactatgtc gttgtacatg gctatttcac cgaagttac taccagcttg agtctacaca 25920
aattactaca gacactggta ttgaaaatgc tacattcttc atcttaaca agcttgtaa 25980
agaccacccg aatgtgcaaa tacacacaat cgacggctct tcaggagttg caaatccagc 26040
aatggatcca atttatgatg agccgacgac gactactagc gtgcctttgt aagcacaaga 26100
aagtgagtac gaacttatgt actcattcgt ttcggaagaa acaggtagt taatagtaa 26160
tagcgtactt cttttcttg ctttcgtgtt attcttgcta gtcacactag ccaccttac 26220
tgcgcttga ttgtgtgct actgctgcaa tattgttaac gtgagtttag taaaaccaac 26280
ggtttacgtc tactcgctg ttaaaaatct gaactcttct gaaggagttc ctgatcttct 26340
ggctaaacg aactaactat tattattatt ctgtttggaa cttaacatt gcttatcatg 26400
gcagacaacg gtactattac cggtgaggag cttaacaac tcctggaaca atggaaccta 26460
gtaatagggt tcctattcct agcctggatt atgttactac aatttgctta ttctaactcg 26520
aacaggtttt tgtacataat aaagcttgtt ttcctctggc tcttggtggc agtaacactt 26580
gcttgcttg tgcttgctgc tgtctacaga attaatggg tgactggcgg gattgagatt 26640
gcaatggctt gtattgtagg ctgatgtgg cttagctact tcgttgcttc cttcaggctg 26700
tttgctcgta cccgctcaat tgggtcattc aaccagaaa caaacattct tctcaatgtg 26760
cctctccggg ggacaattgt gaccagaccg ctcatggaaa gtgaacttgt cattggtgct 26820
gtgatcattc gtggctactt gcgaatggcc ggacactccc tagggcgctg tgacattaag 26880
gacctgcaa aagagatcac tgtggctaca tcacgaacgc tttcttatta caaattagga 26940
gcgtcgagc gtgtaggcac tgattcaggt ttgctgcat acaaccgcta ccgtattgga 27000
aactataaat taaatacaga ccacgccgt agcaacgaca atattgctt gctagtacag 27060
taagtacaa cagatgttc atctgttga cttccaggtt acaatagcag agatattgat 27120

tatcattatg aggactttca ggattgctat ttggaatctt gacgttataa taagttcaat 27180
agtgagacaa ttatttaagc ctctaactaa gaagaattat tcggagttag atgatgaaga 27240
acctatggag ttagattatc cataaaacga acatgaaaat tattctcttc ctgacattga 27300
ttgtatttac atcttgcgag ctatatcact atcaggagtg tgtagaggt acgactgtac 27360
tactaaaaga acctgcccc tcaggaacat acgagggcaa ttcaccattt caccctcttg 27420
ctgacaataa atttgacta acttgacta gcacacactt tgcttttgct tgtgctgacg 27480
gtactcgaca tacctatcag ctgctgcaa gatcagtttc accaaaactt tcatcagac 27540
aagaggaggt tcaacaagag ctctactcgc cacttttct cattgttgct gctctagat 27600
tttaatact ttgcttcacc attaagagaa agacagaatg aatgagctca cttaattga 27660
cttctatttg tgcttttag ctttctgct attccttgtt ttaataatgc ttattatatt 27720
ttggtttca ctcgaaatcc aggatctaga agaacttgt accaaagtct aaacgaacat 27780
gaaacttctc attgtttga ctgtatttc tctatgcagt tgcatacgca ctgtagtaca 27840
gctgtgca tctaataaac ctcatgtgct tgaagatcct tgcctactg gttaccaacc 27900
tgaatggaat ataaggtaga acactagggg taatacttat agcactgctt ggctttgtgc 27960
tctaggaaag gttttacctt tcatagatg gcacactatg gttcaaact gcacaccta 28020
tgttactatc aactgtcaag atccagctgg tggcgctt atagctaggt gttggtacct 28080
tcatgaaggt caccaaactg ctgcatttag agacgtattt gttgtttta ataaacgaac 28140
aaattaaat gtctgataat ggacccaat caaaccaacg tagtgcccc cgattacat 28200
ttggtggacc cacagattca actgacaata accagaatgg aggacgcaat ggggcaaggc 28260
caaacagcg ccgacccaa ggtttacca ataatactgc gtcttggtc acagctctca 28320
ctcagcatgg caaggaggaa ctagattcc ctgaggcca gggcggtcca atcaacacca 28380
atagtgtcc agatgacaa attggctact accgaagagc taccgacga gttcgtggtg 28440
gtgacggcaa aatgaaagag ctacgcccc gatggtactt ctattaccta ggaactggcc 28500
cagaagcttc acttcctac ggcgctaaca aagaaggcat cgtatgggtt gcaactgagg 28560
gagccttgaa tacacccaa gaccacattg gcaccgcaa tcctaataac aatgctgcca 28620
ccgtgctaca acttctcaa ggaacaacat tgccaaaagg cttctacga gaggaagca 28680
gaggcgag tcaagcctt tctgctct catcacgtag tcgcggtaat tcaagaaatt 28740
caactcctgg cagcagtagg ggaaattctc ctgctcgaat ggctagcgga ggtggtgaaa 28800
ctgccctcg gctattgctg ctgacagat tgaaccagct tgagagcaaa gtttctggt 28860
aaggccaaca acaacaaggc caaactgtca ctaagaaatc tgctgctgag gcatctaaaa 28920
agcctcgcca aaaacgtact gccacaaaac agtacaacgt cactcaagca ttgggagac 28980
gtggtccaga acaaacccaa ggaaatttcg gggaccaaga cctaatacaga caaggaactg 29040

attacaaaca ttggccgcaa attgcacaat ttgctccaag tgcctctgca ttctttggaa 29100
gtgcacgcat tggcatggaa gtcacacctt cgggaacatg gctgacttat catggagcca 29160
ttaaattgga tgacaaagat ccacaattca aagacaacgt catactgctg aacaagcaca 29220
ttgacgcata caaacattc ccaccaacag agcctaaaaa ggacaaaaag aaaaaaactg 29280
atgaagctca gcctttgccg cagagacaaa agaagcagcc cactgtgact cttcttctg 29340
cggctgacat ggatgatttc tccagacaac ttcaaaattc catgagtga gcttctgctg 29400
attcaactca ggacataaaca ctcatgatga ccacacaagg cagatgggct atgtaaactg 29460
tttcgcaatt ccgtttacga tacatagtct actctgtgc agaataaatt ctcgtaacta 29520
aacagcacia gtaggtttag ttaacttta tctcacatag caatcttta tcaatgtgta 29580
acattaggga ggacttgaaa gagccaccac atttcatcg aggcacgcg gactacgac 29640
gagggtagc tgaataatgc tagggagagc tgcctatatg gaagagccct aatgtgtaaa 29700
attaatttta gtagtgctat ccccatgtga tttaaatagc ttcttaggag aatgacaaaa 29760

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 2004 / 000645

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int Cl.⁷:

C12N 15/50, C07K 14/165, 16/00, A61K 39/215, 39/395, 48/00, C12Q 1/04, 1/68, C12N 15/861, A61K 35/76, A61P 31/14
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int Cl.⁷: C12N, C07K, A61K, C12Q, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Int Cl.⁷: C12P, G01N

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, PAJ, CPRS, CNKI, CA, PUBMED, BA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Tsinghua University (Natural Science) Vol. 43 No. 5, 30. May 2003 (30.05.2003), Tao Shengce et al, "Fabrication and application of SARS coronavirus gene chips for preliminary clinical sample testing", pp. 715-720	1, 19, 22-23
T	Journal of First Military Medical University Vol. 23 No. 6, 30. Jun. 2003 (30.06.2003), Wang Zhanhui et al, "Molecular virus evidence that SARS virus affecting human are derived from Caver fox", whole text	1, 23
PA	CN A 1449826 (武汉大学) 22.Oct. 2003 (22.10.2003), whole text	12
PX	THE LANCET, Vol. 362 No. 9399, 6.Dec.2003 (06.12.2003), Wentao Gao 等, "Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys" Abstract	38-53

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--	---

Date of the actual completion of the international search
18.Oct. 2004 (18.10.2004)

Date of mailing of the international search report

04 NOVEMBER 2004 (04.11.2004)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

DU Jinping

Telephone No. 86-10-62085297



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 2004 / 000645

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 54-93
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims Nos: 54-93 relate to "methods for adjusting immunity response against SARS virus infections in human beings", "methods for immunize a subject against SARS virus infections" and "methods for treating SARS virus infections in a subject", the situation listed under the PCT rule 39 (1) (iv) not required to be searched.
2. ☒ Claims Nos.: 2-11, 13-18, 20-21, 34-37
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims Nos.: 2-11, 13-18, 20-21, 34-37 are so unclear that no meaningful international search can be carried out.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 2004 / 000645

A. 主题的分类

Int Cl.⁷:

C12N 15/50, C07K 14/165, 16/00, A61K 39/215, 39/395, 48/00, C12Q 1/04, 1/68, C12N 15/861, A61K 35/76, A61P 31/14
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

Int Cl.⁷: C12N, C07K, A61K, C12Q, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

Int Cl.⁷: C12P, G01N

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

EPODOC、WPI、PAJ、CPRS、CNKI、CA、PUBMED、BA

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	清华大学学报(自然科学版) 第 43 卷 第 5 期, 30.5 月 2003 (30.05.2003), 陶生策等, “SARS 冠状病毒基因芯片的制作与初步临床样本验证”, 第 715-720 页	1, 19, 22-23
T	第一军医大学学报 第 23 卷 第 6 期, 30.6 月 2003 (30.06.2003), 王战会等, “人类感染的 SARS 病毒来源于果子狸的分子病毒学依据”, 全文	1, 23
PA	CN A 1449826 (武汉大学) 22.10 月 2003 (22.10.2003), 全文	12
PX	THE LANCET, 第362卷 第9399期, 6.12月2003 (06.12.2003), Wentao Gao等, “Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys” 摘要	38-53.

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“B” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“T” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

18.10 月 2004 (18.10.2004)

国际检索报告邮寄日期

04.11月 2004 (04.11.2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

杜金萍

电话号码: (86-10) 62085297



国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 2004 / 000645

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求: 54-93

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

权利要求 54-93 涉及“调节针对人 SARS 病毒感染的免疫反应的方法”、“免疫受试者抵抗 SARS 病毒感染的方法”、“治疗受试者 SARS 病毒感染的方法”, 属于专利合作条约实施细则第 39 条第 1 款第 4 项规定的无须检索的情形。

2. ☒ 权利要求: 2-11、13-18、20-21、34-37

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,

具体地说: 权利要求 2-11、13-18、20-21、34-37 由于不清楚, 无法进行有意义的检索。

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

☐ 支付附加检索费时未提交异议书。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.